

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. W. BUCHALLA

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BEDEUTUNG DER MAP-KINASEN IN DER MONOMER-INDUZIERTEN
APOPTOSE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Johannes Maximilian Klement

2015

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. W. BUCHALLA

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BEDEUTUNG DER MAP-KINASEN IN DER MONOMER-INDUZIERTEN
APOPTOSE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Johannes Maximilian Klement

2015

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Helmut Schweikl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dipl.-Ing. (FH) Martin Rosentritt
Tag der mündlichen Prüfung:	03. Februar 2016

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		9
1	Einleitung	10
1.1	Zahnärztliche Komposite	10
1.2	Zytotoxizität zahnärztlicher Monomere	12
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies	14
1.4	Apoptose durch zahnärztliche Monomere	16
1.5	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	17
1.5.1	Allgemeines zu MAPK	17
1.5.2	Aktivierung von MAPK durch ROS	18
1.5.3	MAPK im zellulären Immunsystem	19
1.5.4	MAPK in der Regulation des Zellzyklus	20
1.5.5	MAPK in der Apoptose	20
1.5.6	Die Aktivierung von MAPK durch dentale Monomere	21
2	Fragestellung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien	25
3.1.2	Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultivierung	26
3.1.3	Lösungen für den Nachweis von Apoptose	27
3.1.4	Lösungen für den Kristallviolett-Test	28
3.1.5	Verbrauchsmaterial	28
3.1.6	Geräte	29
3.1.7	Software	29

3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellkultur	30
3.2.2	Herstellung der Expositionslösungen	30
3.2.3	Nachweis der Zytotoxizität (Kristallviolett-Test)	31
3.2.3.1	Aufbau und Ablauf Kristallviolett-Test	31
3.2.3.2	Fixierung der Zellkulturen	32
3.2.3.3	Kristallviolettfärbung	32
3.2.3.4	Photometrische Messung	33
3.2.3.5	Auswertung und Statistik	33
3.2.4	Bestimmung der HEMA-induzierten Apoptose	33
3.2.4.1	Aussaat der Zellen	33
3.2.4.2	Versuchsdurchführung	34
3.2.4.3	Zellernte	34
3.2.4.4	Darstellung von Zellen in Apoptose oder Nekrose	34
3.2.4.5	Durchflusszytometrie	35
3.2.4.6	Messprinzip der Durchflusszytometrie	35
3.2.4.7	Einstellung der Geräteparameter	36
3.2.4.8	Darstellung der Messdaten	37
3.2.4.9	Auswertung und Statistik	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Zytotoxizität von HEMA in Mausmakrophagen	40
4.1.1	Zytotoxizität von HEMA nach Inhibition der MAPK ERK1/2	40
4.1.2	Zytotoxizität von HEMA nach Inhibition der MAPK p38	41
4.1.3	Zytotoxizität von HEMA nach Inhibition der MAPK JNK	42
4.1.4	Zytotoxizität von Camptothecin in Anwesenheit von MAPK Inhibitoren	43
4.2	HEMA-induzierte Apoptose in Mausmakrophagen	45
4.2.1.	HEMA-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK ERK1/2	45
4.2.2.	HEMA-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK p38	47
4.2.3.	HEMA-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK JNK	49

4.2.4.	HEMA-induzierte Apoptose in Anwesenheit von NAC	51
4.2.5.	Induktion von Apoptose durch Camptothecin	52
4.2.5.1	Camptothecin-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK MEK1/2	53
4.2.5.2	Camptothecin-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK p38	55
4.2.5.3	Camptothecin-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK JNK	57
4.2.5.4	Camptothecin-induzierte Apoptose in Gegenwart von NAC	59
5	Diskussion	61
5.1	Zytotoxizität von HEMA	62
5.2	Die Bedeutung von MAPK für die Zytotoxizität von HEMA	63
5.3	Die Bedeutung von NAC für die HEMA-induzierte Apoptose	65
5.4	Der Einfluss von LPS auf die HEMA-induzierte Apoptose	67
6	Zusammenfassung	71
7	Abbildungsverzeichnis	73
8	Literaturverzeichnis	74
9	Danksagung	87
10	Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

Bis-GMA	Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium- freie phosphatgepufferte Kochsalzlösung
CQ	Campherchinon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMT	N,N-Dimethyl-p-Toluidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	foetal bovine serum
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GSH	Gluthation
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
KVT	Kristallviolett-Test
LPS	Lipopolysaccharid
NAC	N-Acetylcystein
NF- κ B	Nuklearfaktor-kappa B
PBS	phosphate buffered saline (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-EDTA	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit EDTA
PI	Propidiumjodid
ROS	reactive oxygen species (reactive Sauerstoffspezies)
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
SSB	Einzelstrangbruch
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
UDMA	Urethandimethacrylat
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Zahnärztliche Komposite

Die ästhetische Zahnmedizin verlangt nach zahnfarbenen Füllungswerkstoffen und wird nicht zuletzt deswegen schon seit Jahren von Kompositen dominiert. Zahnärztliche Komposite sind Werkstoffe, die aus zwei chemisch verschiedenen Komponenten, einer organischen Kunststoffmatrix und anorganischen Füllstoffen, bestehen (Ferracane, 2011). Durch die Säure-Ätz-Technik (Buonocore, 1955) ist ein retentiver Verbund zwischen Zahn und Kunststoff möglich geworden. Die organische Matrix bildet das Gerüst des Werkstoffes und besteht größtenteils aus verschiedenen Dimethacrylaten, die als Basismonomere und Comonomere fungieren. Basismonomere sind hochmolekulare Monomere, beispielsweise das Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat (Bis-GMA, Bis-4(2-hydroxy-3-methacryloxy-propyloxy)-phenyl-propan), nach seinem Erfinder auch „Bowen-Monomer“ genannt (Bowen, 1963), oder das Urethandimethacrylat (UDMA). Aufgrund ihrer hohen Viskosität werden ihnen niedrigmolekulare Verdünner (Comonomere) zugesetzt, wie das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA). Aber auch andere Comonomere, beispielsweise das 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) werden bei speziellen Anwendungen, etwa in Dentinadhäsiven, eingesetzt (Abb.1) (Peutzfeldt, 1997; Rueggeberg, 2002).

Die anorganischen Füllkörper wie Bariumglas und Siliziumdioxid, die meist mit mehr als 50% Gewichtsanteil in einem dentalen Kunststofffüllungsmaterial enthalten sind, verbessern die mechanischen Eigenschaften wie Abrasions- und Standfestigkeit und verringern innere Spannungen sowie die Polymerisationsschrumpfung (Munksgaard *et al.*, 1987; Silikas *et al.*, 2000; Ilie und Hickel, 2011). Die Haftung der Füllkörper in der Polymermatrix erfolgt über Kopplungsagenzien, meist trifunktionale Alkoxysilane (Peutzfeldt, 1997). An die Füllkörper binden diese Silane über Si-O-Gruppen, wohingegen die Bindung an das Polymernetz über Methacrylatgruppen funktioniert (Peutzfeldt, 1997; Lim *et al.*, 2002). Initiatoren, Stabilisatoren (Hydrochinon), Inhibitoren (butyliertes Hydroxytoluol) und Katalysatoren steuern die Polymerisation der Monomere der organischen Matrix (Ferracane, 1995; Atsumi *et al.*, 2001).

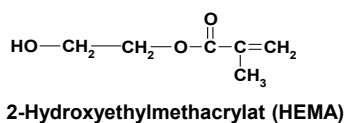
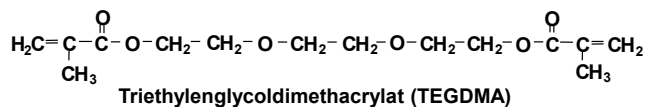
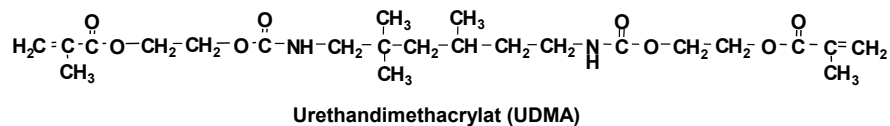
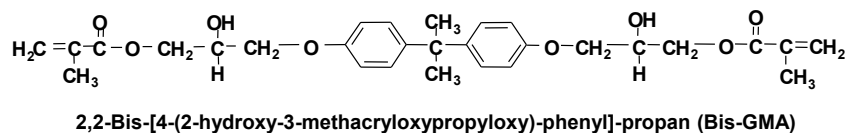


Abb. 1: Basismonomere, Comonomere und Moleküle für die Polymerisationsreaktion der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite.

Die Polymerisation der Komposite wird meistens mit sichtbarem Licht initiiert. Dabei bildet beispielsweise ein Initiator-Molekül wie Campherchinon (CQ) bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm Radikale, die über eine radikalische Kettenreaktion die Polymerisation der Monomere der organischen Matrix auslösen (Atsumi *et al.*, 2001). Bei eingeschränkter Möglichkeit der Lichthärtung kommen dualhärtende Katalysatorsysteme zur Initiation der Polymerisation zum Einsatz, wie zum Beispiel das System aus den Redoxpartnern Benzoylperoxid und dem tertiären Amin N,N-Dimethyl-p-Toluidin (DMT) (Dnebosky *et al.*, 1975).

Das Prinzip der konventionellen Komposite besteht in einer Monomer-Polymer-Konversion. Die Polymerisation der Monomere bleibt jedoch stets unvollständig, die nicht polymerisierten Monomere verbleiben in der harten Polymermatrix und können im Laufe der Tragedauer der Restauration über das aggressive speichelfeuchte Milieu der Mundhöhle aus der Füllung diffundieren. Abhängig vom Lösungsmittel wurden experimentell teilweise mehr als dreißig verschiedene Komponenten in Extrakten polymerisierter Komposite auf Acrylatbasis nachgewiesen (Pelka *et al.*, 1999; Michelsen *et al.*, 2003; Sideridou und Achillas, 2005; Sevkusic *et al.*, 2014). Zudem können die Esterasen im Speichel und Bakterien in der Mundhöhle langfristig die Integrität der Komposite zerstören (Santerre *et al.*, 2001; Finer *et al.*, 2004;

Delaviz *et al.*, 2014). Es ist außerdem plausibel, dass Monomere restaurativer Komposite in tiefen Kavitäten auch über das tubuläre Dentin das Pulpagewebe erreichen und darauf wirken können (Noda *et al.*, 2002).

Die Komposite auf Acrylatbasis schrumpfen in Folge der Polymerisationsreaktion der Komponenten der organischen Matrix etwa zwei bis drei Volumenprozent (Braga und Ferracane, 2004; Ferracane, 2011). Dies ist ein großer Nachteil in der klinischen Anwendung dieser Materialien, weil es zur Ausbildung von Randspalten zwischen dem Füllungswerkstoff und der verbliebenen Zahnhartsubstanz führt. Der Randspalt ist ein optimaler Schlupfwinkel für Plaquebakterien. Da in diesen Nischen auch bei guter Mundhygiene keine Reinigung möglich ist, kommt es zur Bildung von Sekundärkaries, welche momentan die häufigste Ursache für die Erneuerung zahnärztlicher Restaurationen ist (Dauvillier *et al.*, 2000; Mjor und Gordan, 2002; Wiegand *et al.*, 2007; Kuper *et al.*, 2015).

Eine neue Generation dentaler Komposite basiert auf der Verwendung ringöffnender Substanzen als Komponenten der organischen Matrix, beispielsweise Silorane, die dazu beitragen sollen, die Polymerisationsschrumpfung dentaler Komposite zu vermindern (Weinmann *et al.*, 2005; Ilie und Hickel, 2011; Walter *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2015). Silorane verknüpfen die vorteilhafte Eigenschaft der Biokompatibilität von Siloxanen mit der hohen Reaktivität von Oxiranen (Epoxidverbindungen) (Schweikl *et al.*, 2004; Kostoryz *et al.*, 2007).

1.2 Zytotoxizität zahnärztlicher Monomere

Nach heutigem Stand des Wissens werden zytotoxische Effekte dentaler Komposite von Substanzen der organischen Matrix, wie Basismonomeren und besonders Comonomeren, hervorgerufen (Hanks *et al.*, 1991; Yoshii, 1997; Geurtsen, 1998; Thonemann *et al.*, 2002). Restmonomere in der organischen Matrix können in angrenzenden Geweben, wie der Mundschleimhaut oder der Pulpa, biologische Reaktionen auslösen, da sie unter klinischen Bedingungen ausgelaugt werden (Schmalz, 1998). Extrakte von Kompositen auf Acrylatbasis wirken abhängig von den experimentellen Parametern (Polymerisation, Liegezeit, Expositionsdauer) durchaus unterschiedlich zytotoxisch (Geurtsen, 2000; Schweikl *et al.*, 2005b). Strukturaktivitätsuntersuchungen zeigten, dass Acrylate toxischer sind als Methacrylate und difunktionelle Moleküle wie das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) wirksamer

sind als monofunktionelle Moleküle, etwa das 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) (Yoshii, 1997).

Der erste Indikator der Toxizität vieler reaktiver organischer Substanzen ist oft die intrazelluläre Verarmung an Glutathion (GSH) (Watson *et al.*, 2003). Das nicht-enzymatische Antioxidans Glutathion schützt die Zellen vor Beschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Watson *et al.*, 2003; Meyer und Hell, 2005). So wurde gezeigt, dass die Zytotoxizität des Comonomers TEGDMA mit einem schnellen Abfall der intrazellulären Glutathionkonzentration verbunden ist (Stanislawski *et al.*, 2000; Engelmann *et al.*, 2002; Stanislawski *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2004). Andererseits ist die Korrelation von Zytotoxizität und Verfügbarkeit von Glutathion in monomer-exponierten Zellen nicht immer eindeutig (Ansteinsson *et al.*, 2013). Unter dem Einfluss von TEGDMA wurde in Zellen der humanen Mundschleimhaut eine Verringerung von GSH beobachtet, und parallel dazu stieg der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Möglicherweise ist der Abfall an GSH der Grund für den Anstieg von ROS, die letztlich zytotoxische Effekte von Monomeren verursachen (Stanislawski *et al.*, 2003; Krifka *et al.*, 2013). Die Konzentration an ROS in primären humanen Pulpazellen und Fibroblasten der Haut wurde durch zahnärztliche Adhäsivsysteme, Campherchinon oder durch das Monomer HEMA erhöht (Atsumi *et al.*, 2004; Spagnuolo *et al.*, 2004a; Spagnuolo *et al.*, 2004b; Chang *et al.*, 2005; Krifka *et al.*, 2012b). Der Abfall an GSH ist aber vermutlich nicht mit einem Anstieg an oxidiertem GSH, dem Glutathiondisulfid (GSSG) verbunden (Lefevre *et al.*, 2004; Walther *et al.*, 2004). Anscheinend wird auch die Erzeugung von Zellschäden durch TEGDMA oder HEMA durch Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), Ascorbat oder Trolox (Vitamin E) verhindert (Stanislawski *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2008; Spagnuolo *et al.*, 2013). NAC schützte sogar Pulpazellen gegen die Toxizität von PMMA in vivo (Paranjpe *et al.*, 2008).

Monomere können auch zentrale Leistungen von Zellen des Immunsystems inhibieren, beispielsweise die MAPK-abhängige Expression von Oberflächenantigenen oder die Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation der Zellen mit einem Endotoxin (LPS) pathogener Organismen (Eckhardt *et al.*, 2009b; Samuelsen *et al.*, 2011; Bolling *et al.*, 2013). Außerdem ist auch die Induktion genotoxischer Effekte durch TEGDMA oder HEMA nachgewiesen (Schweikl *et al.*, 2006; Lottner *et al.*, 2013). Für genotoxische Agenzien ist bekannt,

dass sie als Folge von DNA-Schäden die Mechanismen der Regulation des Zellzyklus aktivieren. So führen induzierte DNA-Schäden direkt oder indirekt, etwa über die Erzeugung einer erhöhten Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in normalen eukaryontischen Zellen zu einer Verzögerung des Zellzyklus (Kaina, 2003; Roos und Kaina, 2013). Das bifunktionelle Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) verursachte genotoxische Effekte in Säugetierzellen. Die Häufigkeit von Genmutationen stieg bei Exposition mit TEGDMA dosisabhängig um mehr als das zehnfache (Schweikl *et al.*, 1998). Zudem induzierten die Monomere TEGDMA und HEMA einen Anstieg der Zahl an Mikrokernen, ein Anzeichen für Chromosomenaberrationen und somit ein weiterer Hinweis auf eine zellschädigende Wirkung der Substanz (Schweikl *et al.*, 2001). Im Unterschied zu TEGDMA wirkte das monofunktionale Monomer HEMA in Genmutationstests nicht mutagen (Schweikl *et al.*, 1998). Dennoch sollte auch HEMA durchaus DNA-Schäden verursachen können, die Apoptose und Zellzyklusarrest zur Folge haben (Spagnuolo *et al.*, 2004b; Schweikl *et al.*, 2005a; Krifka *et al.*, 2013).

Ebenso wurde berichtet, dass Stammzellen von Milchzähnen bei Langzeitexposition gegen HEMA oder TEGDMA eine verspätete Differenzierung und gestörte Mineralisationsprozesse zeigten (Bakopoulou *et al.*, 2011; Bakopoulou *et al.*, 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass der monomer-induzierte oxidative Stress wahrscheinlich der Grund für die gestörte Mineralisation ist, da das Antioxidans NAC die Toxizität von Methacrylaten deutlich reduzierte und so die Osteoblastenfunktion erhielt (Yamada *et al.*, 2010; Galler *et al.*, 2011).

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanion (O_2^-) oder das Hydroxylradikal (OH^\bullet) können zelluläre Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide schädigen (Beckman und Ames, 1997; Frank *et al.*, 2000; Kaina, 2003; Mikkelsen und Wardman, 2003; Huang und Manton, 2004). ROS können DNA-Basen oxidieren, so dass in der Folge DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche entstehen oder aber DNA-Quervernetzungen sowie DNA-Protein-Quervernetzungen gebildet werden (Halliwell und Aruoma, 1991; Epe und Hegler, 1994; Wallace, 2002).

Oxidativer Stress bezeichnet eine Störung der zellulären Redoxhomöostase, ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Molekülen und Molekülgruppen. Dieses Ungleichgewicht kann die Ursache für Apoptose aber auch für Altern oder für pathologische Prozesse wie Entzündungen, Karzinogenese, Neurodegeneration und Arthritis sein (Chandra *et al.*, 2000; Zecca *et al.*, 2004; Brune, 2005; Wu *et al.*, 2005; Bubici *et al.*, 2006). Andererseits haben geringe Mengen an ROS und die Redoxhomöostase im Gleichgewicht essentielle Funktionen im Zellmetabolismus. Sie fungieren in der Signaltransduktion, fördern die Zellproliferation und Zellvitalität oder steuern die entsprechende Genexpression (Droge, 2002).

Die Redoxhomöostase wird durch ein Netzwerk aus enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien reguliert (Halliwell, 1999). Das wichtigste nicht-enzymatische Antioxidans ist das Tripeptid Glutathion (GSH), dem die Sulfhydryl-Gruppe (-SH) des Cysteins ihre redox-relevanten Funktionen verleiht. GSH dient als Substrat für die Glutathion-Peroxidase, um die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O zu katalysieren und ist unverzichtbar zur Aufrechterhaltung des Thiolstatus von Proteinen (Lu, 2009). Auch N-Acetylcystein (NAC), die acetylierte Form der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein und direkte Vorstufe des Glutathions, dient als Donator von Sulfhydryl-Gruppen und als direkter ROS Radikalfänger (Soheili Majd *et al.*, 2003; Zafarullah *et al.*, 2003). Durch die Acetylgruppe wird die Reaktivität des Cysteins erhöht und die Aufnahme in die Zelle verbessert.

NAC wird auch zur Behandlung von Mukoviszidose, Bronchitis und anderen Erkrankungen, die mit Verschleimung der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes einhergehen, therapeutisch benutzt (Ardite *et al.*, 2000; Reichenberger und Tamm, 2002; Rochat *et al.*, 2004). Außerdem wird NAC als Antidot bei einer Überdosis von Xenobiotika wie Paracetamol oder chlorierten Kohlenwasserstoffen sowie bei Alkoholismus zum Schutz der Leber eingesetzt (Zafarullah *et al.*, 2003). NAC wirkt über die Stimulation des zentralen Tumorsuppressorgens p53 antiapoptotisch, in Krebszellen dagegen proapoptotisch. NAC ist somit ein potentiell anti-carcinogenes Chemotherapeutikum (Zafarullah *et al.*, 2003).

NAC wird derzeit auf verschiedenen Ebenen der Zellbiochemie untersucht. Veränderungen von Lipiden, Proteinen wie Enzyme, DNA und des Redox-Status der Zelle durch NAC werden diskutiert, sowie direkte Interaktionen mit toxischen

Substanzen (Zafarullah *et al.*, 2003). So wurde auch ein Addukt des Monomers HEMA mit NAC nachgewiesen (Nocca *et al.*, 2010).

Das nicht-enzymatische GSH ist ein Teil der zellulären Redoxhomöostase, die vor allem auch durch gut aufeinander abgestimmte Aktivitäten antioxidativer Enzyme reguliert wird (Valko *et al.*, 2007). Die Superoxiddismutase (SOD1) katalysiert die Dismutation von Superoxid-Anionen (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2). Das resultierende H_2O_2 wird entweder durch die Katalase, die H_2O_2 in O_2 und Wasser abbaut, oder durch die Glutathion-Peroxidase (GPx1/2), die GSH als Elektronendonator verwendet, kontrolliert (Imlay, 2008).

1.4 Apoptose durch zahnärztliche Monomere

Apoptose ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozess mit deutlichen morphologischen Veränderungen betroffener Zellen und Gewebe (Majno und Joris, 1995; Nicholson und Thornberry, 2003). Zellen in Apoptose schrumpfen, das Chromatin des Zellkerns ist kondensiert und liegt außerhalb des Zentrums. Die zelluläre DNA wird durch die Aktivierung von Endonukleasen in Fragmente charakteristischer Größe geschnitten (*DNA laddering*) und die Integrität der Zellmembran geht verloren. Es entstehen membranumstülpte Säckchen (*blebbing*), und der Verlust der Asymmetrie in der Orientierung der Zellmembran wird an der Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Zelloberfläche erkennbar (Kerr *et al.*, 1972; Searle *et al.*, 1982). Apoptose ist ein zelleigenes Programm zur Aktivierung von Proteinen mit sensorischer, regulatorischer und ausführender Wirkung. Dieses Programm wird zum einen über Rezeptoren in der Zellmembran (*death receptor*) vermittelt und führt zur Aktivierung von Effektoren (Caspasen) über regulatorische Proteine (extrinsische Form der Apoptose) (Nicholson und Thornberry, 1997; Shi, 2004). Andererseits nehmen auch Mitochondrien eine zentrale Stellung im Prozess der Apoptose ein (Kuwana und Newmeyer, 2003). Anders als Zellen in Apoptose schwellen Zellen in Nekrose an und werden größer (Oncosis), die Integrität der Zellmembran geht verloren und Zellinhalte werden freigesetzt. Lange wurde Nekrose als ein passiver und unkontrollierter Prozess betrachtet. Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass auch Nekrose ähnlich wie die Apoptose über ein enges Netz von Signaltransduktionswegen reguliert werden kann (Kroemer *et al.*, 2009).

Durch den Hinweis, dass eine erhöhte Menge an ROS als Signalmoleküle für die Induktion der Apoptose entscheidend sind, gewinnt dieser neue Ansatz in der Diskussion von Mechanismen zytotoxischer Effekte dentaler Monomere an Bedeutung. Wie oben diskutiert, verursachen Monomere einen Abfall der Konzentration des intrazellulären Antioxidans GSH, während parallel dazu die Menge an ROS zunimmt (Schweikl *et al.*, 2006; Krifka *et al.*, 2013). Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kunststoffmonomere die Expression stress-reaktiver Gene auf der Transkriptions- und auf der Proteinebene durch eine Akkumulation von ROS verstärken (Krifka *et al.*, 2012b). So ist die Monomer-induzierte Apoptose eine aktive Zellantwort auf ROS, deren Menge die zelleigenen Möglichkeiten zum Erhalt der Redoxhomöostase überschreitet (Forman und Torres, 2001).

Möglicherweise spielt dabei neben der Erzeugung oxidativer DNA-Schäden auch die Aktivierung der zellulären Signaltransduktionswege über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Transkriptionsfaktoren *downstream* durch ROS eine wesentliche Rolle (Krifka *et al.*, 2010).

1.5 Mitogen- aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

1.5.1 Allgemeines zu MAPK

Eukaryontische Zellen reagieren auf exogene und endogene Reize über eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen. Diese werden meist durch Rezeptoren an der Zelloberfläche oder intrazelluläre Sensoren, die verschiedene interne und externe Signale (*stressors*) erkennen, angestoßen und bewirken so zelluläre Reaktionen wie Zellproliferation, Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, die Freisetzung von Zytokinen oder sie leiten Apoptose ein (Takeda *et al.*, 2008). Die Kaskade der MAP-Kinasen ist eine dieser Signalketten (Hayakawa *et al.*, 2006).

In Säugerorganismen werden 14 MAPK in 7 Gruppen zusammengefasst. Seit langem am besten untersucht sind die Mitglieder der drei Familien p38-MAPKs, die *extracellular-signal regulated kinases* (ERK1/2 oder p42/p44-MAPK) sowie die c-Jun NH₂-terminalen Kinasen 1-3 (JNK) (Aicher *et al.*, 1999; Chang, 2001; Puig-Kroger *et al.*, 2001; Cargnello und Roux, 2011). Jede MAPK-Familie steuert bestimmte Zielgene über Transkriptionsfaktoren *downstream* und hat unterschiedliche Aufgaben. Trotzdem gibt es ausgeprägte Interaktionen zwischen den einzelnen

MAPK, so dass man von einem Netzwerk von Signalen und nicht von unabhängigen parallelen Systemen ausgeht (Zhang *et al.*, 1997; Rescigno *et al.*, 1998; Cobb, 1999). Nach dem Erkennen eines Mitogens, also eines Proteins, welches die Zellproliferation anregt, durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche, beispielsweise *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), erfolgt die Weiterleitung des Signals über drei Stufen von MAPK (Beutler, 2004; Cargnello und Roux, 2011). Dazu zählen erstens die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK), zweitens Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MAPKK) und drittens die MAPK selbst (Matsuzawa und Ichijo, 2005; Moens *et al.*, 2013). Die Aktivierung der MAP-Kinasen führte zu so verschiedenen Zellreaktionen wie der Aktivierung der Genexpression der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Verzögerung des Zellzyklus oder der Induktion von Apoptose (Tanoue und Nishida, 2003). So ist beispielsweise die Aktivierung der MAPK JNK und p38 durch Stressfaktoren wie UV-Strahlung, Röntgenstrahlen oder Chemikalien wie Cadmiumchlorid oder Arsenit sowie oxidativer Stress beschrieben (Matsuzawa und Ichijo, 2005; Cargnello und Roux, 2011). Man bezeichnet JNK und p38 auch gemeinsam als SAPK (*stress-activated protein kinases*) (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Auch das Lipopolysaccharid (LPS), ein bakterielles Endotoxin, ist ein wirksamer Aktivator von JNK, p38 und ERK 1/2. MAPK steuern ihrerseits Zielgene *downstream*. So sind aktuell Transkriptionsfaktoren wie etwa Sp1, E2F, Elk-1 oder *activator protein 1* (AP-1) als Ziele von MAPK beschrieben (Murphy und Blenis, 2006; Katz *et al.*, 2007; Krifka *et al.*, 2011).

1.5.2 Aktivierung von MAPK durch ROS

MAPK werden nicht nur durch die Bindung von Liganden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktiviert, sondern auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Mechanismen sind momentan unklar (Son *et al.*, 2013). Es ist allerdings bekannt, dass ROS als *second messenger* in der Steuerung der Zellproliferation über die Aktivierung der MAPK ERK1/2 wirken (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Beispielsweise werden als Reaktion auf eine erhöhte Menge an H₂O₂ oder UV-Strahlung Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) oder PDGF (*platelet-derived growth factor*) phosphoryliert und können über Ras, ein kleines G-Protein, wiederum ERK1/2 aktivieren (Sachsenmaier *et al.*, 1994). So gesehen ist ERK1/2 ein anti-apoptotischer Regulator (Guyton *et al.*, 1996; Cargnello und Roux,

2011). Allerdings unterliegen Zellen durch oxidativen Stress aufgrund von Umwelteinflüssen und einer so gestörten ROS-Homöostase dem Zelltod durch Apoptose (Krifka *et al.*, 2012a; Harijith *et al.*, 2014). Andererseits ist auch bekannt, dass Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC) und Dithiothreitol (DTT) oder auch experimentell überexprimierte antioxidative Enzyme die durch Stresskinasen induzierte Apoptose hemmen können (Maehara *et al.*, 2001; Townsend *et al.*, 2003).

1.5.3 MAPK im zellulären Immunsystem

MAPK haben eine zentrale Bedeutung in der Transduktionskaskade zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Viren und Bakterien oder bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS), ein Glykolipid der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, werden von Monozyten oder Makrophagen abgewehrt (Janeway und Medzhitov, 2002; Rossol *et al.*, 2011). Um diese fremden Organismen oder deren Komponenten zu erkennen, besitzen Zellen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die wichtigste Komponente der Perzeption sind die oben genannten *Toll-like-Rezeptoren* (TLR). Das Endotoxin LPS ist ihr am meisten untersuchter Ligand (Miyake, 2004), der über das LBP (*LPS binding protein*) an das Oberflächenantigen CD14 (*cluster of differentiation 14*) und MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) schließlich an den Rezeptor TLR4 bindet (Ulevitch, 1993; Rossol *et al.*, 2011). In der daraufhin ausgelösten Transduktionskaskade werden über TRAF6 die MAP-Kinasen, vor allem p38 und JNK, aktiviert. Die MAPK steuern dann koordiniert mit Transkriptionsfaktoren, beispielsweise NF- κ B, die spezifischen Reaktionen des angeborenen zellulären Immunsystems, zu denen die Freisetzung von Zytokinen oder die Expression von Oberflächenantigenen wie CD14 zählen (Lee *et al.*, 2007).

Stressoren, wie auch dentale Monomere, beeinflussen diese LPS-stimulierten Signalwege der Freisetzung von Zytokinen oder der Expression von Oberflächenantigenen. So wurde etwa die Freisetzung von TNF- α nach Stimulation mit LPS in zuvor mit TEGDMA oder HEMA behandelten Monozyten stark inhibiert (Noda *et al.*, 2003). Ebenso wurde nach TEGDMA-Exposition sowohl in LPS-stimulierten als auch in ansonsten unbehandelten Makrophagen eine starke Inhibition der Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-10 sowie der Expression einer ganzen Reihe von Oberflächenantigenen nachgewiesen (Eckhardt *et al.*, 2009b; Bolling *et al.*, 2013).

Die Freisetzung, aber auch deren Inhibition erfolgen sehr rasch nach Exposition (Krifka *et al.*, 2011; Ansteinsson *et al.*, 2013; Bolling *et al.*, 2013).

1.5.4 MAPK in der Regulation des Zellzyklus

Die MAPK ERK1/2 und p38 sind als Regulatoren des Zellzyklus beschrieben. ERK1/2 besitzt eine zentrale Funktion für die Zellproliferation und wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt meist über Tyrosinkinase-Rezeptoren und die Aktivierung von Ras, der MAPKK Raf-1 und der nachgeschalteten Aktivierung von MEK1/2, für die bisher außer ERK1/2 keine weiteren Substrate bekannt sind (Chambard *et al.*, 2007). So steuert ERK1/2 die Synthese des Cyclin D1 auf der Transkriptionsebene in Koordination mit der aktivierten PI3-Kinase (Katz *et al.*, 2007). Im Unterschied zu ERK1/2 ist p38 ein negativer Regulator der Synthese von Cyclin D1 (Lavoie *et al.*, 1996; Chambard *et al.*, 2007). An der Steuerung des Arrests des Zellzyklus in Folge von DNA-Schäden durch chemische oder physikalische Agenzien, etwa radioaktive- oder UV-Strahlung, sind die beiden MAPK ERK1/2 und p38 beteiligt (Tang *et al.*, 2002; Golding *et al.*, 2007). Man geht davon aus, dass für diese Art der zellulären Reaktion auf Stressoren der Umwelt eine Interaktion mit dem bekannten Kontrollmolekül ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die hauptsächlich durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird, und dem Transkriptionsfaktor p53 *downstream* von ATM notwendig ist. So wurde beschrieben, dass ERK1/2 das Tumorsuppressorprotein p53 *in vitro* phosphorylierte, nachdem es selbst mit cis-Platin aktiviert wurde (Persons *et al.*, 2000).

1.5.5 MAPK in der Apoptose

Signalwege, die Apoptose auslösen oder das Überleben von Zellen fördern, werden von den MAPK ERK1/2, JNK und p38 reguliert. Welche der MAP-Kinasen spezifisch Apoptose induziert, ist wohl abhängig von den aktivierenden Faktoren, den betroffenen Zelltypen oder der Höhe und der Dauer des Stresses (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Obwohl allgemein angenommen wird, dass ERK1/2 die Zellproliferation und das Zellüberleben fördert und JNK/p38 nicht nur davon verschiedene, sondern sogar entgegengesetzte Wirkung haben, darf man aufgrund neuerer Untersuchungen

doch vermuten, dass auch JNK und p38 Funktionen für das Zellüberleben oder die Zelldifferenzierung haben (Matsuzawa und Ichijo, 2005; Vríz *et al.*, 2014). So führt der Entzug eines Wachstumsfaktors zur dauerhaften Aktivierung von JNK und p38 sowie zur Inhibition von ERK1/2, und diese beiden Wirkungen induzieren Apoptose (Xia *et al.*, 1995).

Die Bildung von ROS scheint, wie oben skizziert, ein ganz wesentlicher Faktor für die Aktivierung von MAPK zu sein. Sowohl ERK1/2 als auch JNK/p38 wurden als Reaktion auf oxidativen Stress aktiviert und bestimmten Zellüberleben oder Apoptose. So führte beispielsweise die Inhibition der Aktivierung von JNK/p38 durch eine Deletion von ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), eine MAPKKK oberhalb der SAPK, zur Resistenz gegen die Induktion von Apoptose durch oxidativen Stress. Der Grund ist wahrscheinlich die Inhibition der späten Aktivierung von JNK/p38 (Tobiume *et al.*, 2001; Matsuzawa *et al.*, 2002; Soga *et al.*, 2012). Somit ist oxidativer Stress wohl ein zentraler Faktor für die Induktion von Apoptose über die Aktivierung von MAP-Kinasen wie p38. Umgekehrt ist Thioredoxin (Trx), ein redox-sensitives und antioxidatives Protein, ein negativer Regulator des ASK1-induzierten p38 Signalwegs ebenso wie die durch oxidativen Stress induzierbare dualspezifische Phosphatase 5 (DUSP5). DUSP5 und Trx inhibieren die durch oxidativen Stress induzierbare Apoptose (Saitoh *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Aktivierung der Expression von DUSP5, eine MAPK-spezifische Phosphatase, auf der Transkriptionsebene in Zellkulturen, die dem Monomer TEGDMA exponiert waren. Diese Aktivierung von DUSP5 verweist auf die Aktivierung des MAPK Signalwegs und seine Kontrolle durch Dephosphorylierung an Serin- oder Threonin-Resten. Anscheinend dephosphoryliert DUSP5 bevorzugt ERK1/2. Interessanterweise scheint die Expression von DUSP5 unter der direkten Kontrolle von p53 zu erfolgen (Schweikl *et al.*, 2008).

1.5.6 Die Aktivierung von MAPK durch dentale Monomere

Monomere aus dentalen Kompositen wie TEGDMA oder HEMA aktivieren MAPK. So wurde berichtet, TEGDMA und HEMA würden nach langen Expositionszeiten ERK1/2 in Speicheldrüsenzelllinien aktivieren, während p38 und JNK durch TEGDMA, jedoch nicht durch HEMA aktiviert wurden (Samuelsen *et al.*, 2007). Da diese Ergebnisse allerdings nur für einen relativ frühen Zeitpunkt (6h) nach

Expositionsstart ermittelt wurden, sind sie nur bedingt aussagekräftig. In humanen Pulpazellen scheint die TEGDMA-induzierte Apoptose nicht über ERK1/2 vermittelt zu sein, da ein spezifischer pharmakologischer Inhibitor dieses Signalwegs die Zahl der Zellen in Apoptose nicht veränderte (Spagnuolo *et al.*, 2004a). Es wurde jedoch eine sehr rasche Aktivierung von ERK1/2 durch HEMA nachgewiesen. Eine deutlich geringere Anzahl überlebender Zellen nach Inhibition von ERK1/2 in Anwesenheit von HEMA verweist darauf, dass ERK1/2 unter diesen Bedingungen eine anti-apoptotische Funktion übernimmt (Spagnuolo *et al.*, 2008).

Eine genaue Betrachtung zeigte schließlich auch die differenzielle Aktivierung von MAPK durch Monomere, wie TEGDMA in Zellen des Immunsystems. So bewirkte zwar die Stimulation der Zellen mit LPS einen deutlichen Anstieg der Menge an phospho-p38 bereits nach 15 min, allerdings aktivierte TEGDMA die p38 MAPK zu diesem frühen Zeitpunkt nicht. Bereits nach einer Expositionszeit von 30 min erhöhte TEGDMA die Menge an phospho-p38 jedoch um den Faktor 2, ERK1/2 oder JNK hingegen wurden nicht aktiviert (Krifka *et al.*, 2010). TEGDMA inhibierte nach 1h oder 2h Exposition sogar die Bildung von phospho-ERK1/2, nach langen Expositionszeiten von 6h und vor allem 24h war jedoch die Expression von ERK1/2, p38 und JNK drastisch erhöht. Die starke Aktivierung von ERK1/2 durch TEGDMA erfolgt dann wahrscheinlich über Signalwege, die dem durch TEGDMA induzierten und wahrscheinlich durch p38 und JNK vermittelten programmierten Zelltod (Apoptose) entgegenwirken. ERK1/2 wird wahrscheinlich als *pro-survival factor* von TEGDMA aktiviert, um das Überleben der Zellen zu fördern, und p38 entgegenzuwirken (Krifka *et al.*, 2010). Die Vermutung, die späte und lang anhaltende Aktivierung von p38 könnte mit der Induktion von Apoptose durch TEGDMA verbunden sein, hat sich jedoch nach Experimenten mit spezifischen, pharmakologisch wirksamen Inhibitoren für ERK1/2, p38 oder JNK bisher nicht bestätigt (Krifka *et al.*, 2011). Andererseits schützte das Antioxidans N-Acetylcystein humane Monozyten vor TEGDMA-induzierten, zytotoxischen Effekten und inhibierte, damit assoziiert, die Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 nach langen Expositionszeiten (Eckhardt *et al.*, 2009a). Sehr ähnliche Ergebnisse wurden in Mausemakrophagen beobachtet (Krifka *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen, die Erzeugung von ROS, die späte Induktion von Apoptose sowie parallel dazu die Aktivierung von MAPK könnten bedeuten, dass Monomere wie TEGDMA oder HEMA Apoptose über oxidative DNA-Schäden oder

über die Aktivierung der MAPK und Transkriptionsfaktoren *downstream* induzieren könnten.

DNA-Schäden könnten über eine Signalkaskade aus ATM, dem Transkriptionsfaktor p53 und p21 die Monomer-induzierte Apoptose auslösen (Lavin und Gueven, 2006; Krifka *et al.*, 2011). Inzwischen wurde auch die Induktion von Apoptose durch HEMA über den intrinsischen Weg als Folge von DNA-Schäden und der damit verbundenen Aktivierung der Signalmoleküle ATM, H2AX und p53 nachgewiesen (Schweikl *et al.*, 2014). Andererseits weiß man, dass die redox-sensitive MAPK-Signalkaskade Transkriptionsfaktoren *downstream* aktiviert, die ihrerseits an der Induktion von Apoptose durch Monomere beteiligt sein könnten. So inhibierte TEGDMA die Expression der stressinduzierbaren Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2 oder ATF-3 (Krifka *et al.*, 2011). Dabei ist ATF-2 sowohl für die Koordination von Zellantworten auf DNA-Schäden als auch für die Induktion von Apoptose nötig (Maekawa *et al.*, 2007; Bhoumik und Ronai, 2008). Ebenso scheint ATF-3 stress-induzierte adaptive Zellantworten in der Apoptose zu steuern (Yan *et al.*, 2005).

2 Fragestellung

Comonomere zahnärztlicher Komposite wie 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) sind *in vitro* zytotoxisch. Der Grund dafür ist die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit der Verlust der zellulären Redoxhomöostase. Weil außerdem Monomere *in vitro* zelluläre Signalwege wie Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktivieren können, darf man vermuten, dass die Aktivierung von MAPK durch Phosphorylierung ein Mechanismus der Zytotoxizität dentaler Monomere sein könnte. Bisher konnte nur die in der Zeit koordinierte Induktion von Apoptose durch Monomere und eine Aktivierung von MAPK gezeigt werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivierung von MAPK und der Monomer-induzierten Apoptose wurde bisher nicht nachgewiesen. Außerdem können Lipopolysaccharide (LPS) als Endotoxine Gram-negativer kariöser Keime in tiefen kariösen Läsionen über Dentin diffundieren, Pulpagewebe erreichen und durch die Aktivierung des zellulären Immunsystems eine Entzündungsreaktion hervorrufen. In besonderen klinischen Situationen stressen daher sowohl kariöse Keime und deren Endotoxine als auch Monomere das Pulpagewebe.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, durch die Verwendung spezifischer pharmakologischer Inhibitoren für die MAPK ERK1/2 (PD98059), p38 (SB203580) und JNK (SP600125) zu analysieren, ob und wie MAPK an der HEMA-induzierten Apoptose beteiligt sind.

In Einzelnen sollte untersucht werden:

1. Welche der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 oder JNK vermittelt die Monomer-induzierte Apoptose von HEMA?
2. Verändert die Anwesenheit von LPS die Wirkung von HEMA auf die Zellvitalität?
3. Wie beeinflusst die Anwesenheit des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) die Wirkung von HEMA auf die Zellvitalität?

Die Experimente wurden mit RAW264.7 Mausemakrophagen durchgeführt, die als Modell für die Analyse von Reaktionen von Zellen des Immunsystems auf die Exposition gegen zahnärztliche Monomere dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Annexin V-PE Apoptosis Detectionkit	MBL, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Camptothecin (Cat.nr.JM-1039-1; Lot. 30739)	MBL, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Dimethylsulfoxid (Cat.nr. 2064)	Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA
EDTA-Natrium-Salz (Cat.nr.03685)	Fluka AG, Schweiz
FBS Foetal Bovine Serum (Cat.nr.10108-165)	Gibco, Paisley, Schottland
Glutardialdehyd 25%	Merck, Darmstadt
HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) (Cat.nr.0588; Lot.S5400388003)	Merck, Darmstadt
JNK II Inhibitor SP600125 (Cat.nr.420128; Lot.D00082098)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Kristallviolett (cristal violet) (C0775)	Sigma, Taufkirchen
Lipopolysacharid LPS (Cat.nr.L2880-10; Lot.017K4098)	Sigma, Taufkirchen
PD98059 (Cat.nr.513001; Lot.D00068254) mit 99,7% Reinheit	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
NAC (N-Acetylcystein) (Cat.nr.A9165-25g; Lot.077K07482)	Sigma, Taufkirchen

SB203580 (Cat.nr.1202; Lot.4A/89999)	Tocris, R&D Systems, Wiesbaden
Penicillin-Streptomycin (Cat.nr.15140- 122)	Gibco BRL, Eggenstein
Propidium-Jodid (PI) (Lot.: 019K1149 aus Kit BV-K101-3)	MBL, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
RPMI 1640 Medium (Cat.nr.P04- 16500 mit L-Glutamin, 2g/l NaHCO ₃)	PAN Biotech, Aidenbach
Na-Pyruvat (Cat.nr.11360-39)	Gibco BRL, Eggenstein
TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat) (Cat.nr.26.154-8; Lot.09004BC-206)	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau 0,4% (Cat.nr.15250-061)	Gibco, Invitrogen Corp.
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃ ; 6406)	Merck, Darmstadt

3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultivierung

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden steril filtriert und vor Gebrauch im Wasserbad (37 °C) vorgewärmt. Jedem Liter Medium wurden 10 ml Penicillin-Streptomycin–Stammlösung (100 U/ml Penicillin und 10µg/ml Streptomycin) zugegeben.

Medium für RAW 264.7 Mausmakrophagen (500 ml)

RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2 g/l NaHCO₃

+ 50 ml FBS

+ 5 ml Natriumpyruvat (1mmol/L)

+ 5 ml Penicillin /Streptomycin

10x CMF-PBS (Calcium- und Magnesiumfreier Phosphatpuffer)

80 g NaCl

2 g KCl

9,1 g Na₂HPO₄

2 g KH₂PO₄

add 1000 ml aqua demin. (18 MOhm)

1x CMF-PBS (Calcium- und Magnesiumfreier Phosphatpuffer)

100 ml 10 x CMF-PBS

add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

10x CMF-PBS-EDTA (Phosphatgepufferte Salzlösung mit EDTA) (pH 7.3)

80,0 g Natriumchlorid

2,0 g Kaliumchlorid

2,0 g Natriumhydrogenphosphat

9,1 g Kaliumhydrogenphosphat

2,0 g EDTA-Natriumsalz (Titriplex III)

Add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1x CMF-PBS-EDTA (Phosphatgepufferte Salzlösung mit EDTA)

100 ml 10x CMF-PBS-EDTA

add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

3.1.3 Lösungen für den Nachweis von Apoptose

Binding-Buffer für Annexin aus dem Apoptose Kit (MBL)

FACS-Puffer

10 ml FBS

10 ml 10% Natriumazid

auf 1000 ml mit 1x CMF-PBS

Propidiumiodid (PI)

950 µl Wasser, 50 µl PI 1mg/ml

3.1.4 Lösungen für den Kristallviolett-Test

70% Ethanol

70 ml Ethanol

30 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1% Glutardialdehyd-Lösung

4 ml Glutardialdehyd (25%)

96 ml Aqua demin. (18 MOhm)

0,2% Kristallviolett-Stammlösung

0,2 g Kristallviolett (cristal violet)

add 100 ml Aqua demin. (18 MOhm)

0,02% Kristallviolett-Färbelösung

10 ml 0,2%-ige Stammlösung

90 ml Aqua demin. (18 MOhm)

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Cellstar Tubes [188271]

Falconröhrchen (50ml) [2070]

Falconröhrchen (15ml) [2052]

Kulturflaschen T162 (162 cm²) [3151]

Pipettenspitzen 1000um [70762]

Pipettenspitzen 200um [70760002]

Reagenzglas mit Rundboden

Reagent Reservoir 50ml [4870]

Steritop ExpressPlus 0,22um

Stripetten 5- 50ml

Varipetten 100-1000µl, 10-100µl

Zellschaber [353087]

6-Well-Platten, Cat.No.657165

96-Well-Platten, Cat.No.3598

Greiner, Frickenhausen

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

Costar, Corning Inc., NY, USA

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

Becton Dickinson, New Jersey

Costar, Corning Inc., NY, USA

Millipore, Billerica, MA, USA

Costar, Corning Inc., NY, USA

Eppendorf, Hamburg

Falcon, BD

Greiner, Frickenhausen

Costar, Corning Inc., NY, USA

3.1.6 Geräte

Begasungsbrutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FacsCanto	Becton Dickinson, Heidelberg
Lichtmikroskop Diavert [Ser.Nr.896460]	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer IKA- COMBIMAG RCT	IKA-Werk GmbH, Staufen
Milli-QUF plus	Millipore, Billerica, MA, USA
pH-Meter Kalimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe accu jet	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Purification pack (CPMQ 004D2)	Millipore, Billerica, MA, USA
Präzisionswaage MC 210 P	Sartorius, Göttingen
Sartorius Waage 1404 MP 8; No.3310033	Sartorius, Göttingen
Spektralphotometer Infinite F200	TECAN GmbH, Männedorf, Schweiz
Sterile Werkbank Laminar Flow Gelaire	FlowLaboratories, Merckenheim
BSB 4	
Schüttler G.F.L.- 3018	GFL, Burgwedel
Vortex, Reax Top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad Schüttler G.F.L. -1083	GFL, Burgwedel
Zählkammer „Neubauer Improved“	Brand, Wertheim
Zentrifuge Rotixa/P Typ 4202 Nr.2181	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen

3.1.7 Software

FACSDiva 5.0.2 Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)
TECAN Magellan - Data Analysis Software Infinite 200 PRO
SPSS, Vers. 18.0 (SPSS, Chicago IL, USA)
SigmaPlot Version 8.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen außerhalb eines Organismus wird als Zellkultur bezeichnet. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RAW 264.7 Mausmakrophagen (ATCC TIB-71) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen. Die Zellen wurden als Monolayer in RPMI-Medium in T162-Flaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Sobald ein subkonfluent Monolayer gewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Altmedium abgekippt. Danach wurde der Zellmonolayer mit 5 ml 1x PBS-EDTA gewaschen. Um die adhären Zellen abzulösen, wurden noch einmal 5 ml 1x PBS-EDTA auf die Zellen pipettiert und diese anschließend vorsichtig vom Flaschengrund geschabt. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Hämozytometer nach Trypanblaufärbung, nachdem die Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und erneut resuspendiert worden war. Es wurden pro T162 Flasche $0,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät, um nach 2-3 Tagen einen subkonfluenten Monolayer zu erreichen.

3.2.2 Herstellung der Expositionslösungen

Zunächst wurden Stammlösungen vorbereitet. Dazu wurde 200,6 µl HEMA Orginallösung zu 79799,4 µl Medium pipettiert (=20 mM HEMA). Außerdem wurden LPS (10µg/ml) und Camptothecin (2 mM) als Stammlösungen in Zellkulturmedium gelöst. Lösungen von MAPK-Inhibitoren wurden aufgrund früherer Vorversuche (nicht gezeigt) in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Sie wurden zunächst doppeltkonzentriert angesetzt und dann für die Vorinkubation ohne HEMA (vgl. unten) in einem Falconröhrchen 1 plus 1 mit Medium oder für die Exposition nach der Vorinkubation 1 plus 1 mit Medium oder doppeltkonzentrierten HEMA-Lösungen (in RPMI-Medium) verdünnt. Es wurden jeweils zwei verschiedene Inhibitor-konzentrationen geprüft. Der MEK-Inhibitor (PD98059) wurde in Konzentrationen von 10µM und 30µM, der p38 Inhibitor (SB203580) als 10µM und 30µM und der JNK II-Inhibitor (SP600125) mit 3µM und 10µM analysiert.

N-acetylcystein (NAC) wurde zuerst in Zellkulturmedium (250 mmol/L Stammlösung) gelöst und dann in Medium verdünnt (10 mmol/L). Alle Lösungen mit NAC wurden eine Stunde vor einem Experiment auf pH 7.2 bei 37 °C eingestellt. Zellkulturen in Experimenten mit NAC wurden eine Stunde mit NAC vorinkubiert.

3.2.3 Nachweis der Zytotoxizität (Kristallviolett-Test)

Der Kristallviolett-Test ist ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Färbbarkeit von Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett (Gentianaviolett) beruht (Flick und Gifford, 1984). Man macht sich bei diesem Test zu Nutze, dass der an Zellen fixierte Farbstoff nicht mit Wasser abgespült werden kann. Zellen in Kulturschalen werden zunächst gefärbt, dann mit Wasser mehrmals gespült, und anschließend wird der fixierte Farbstoff mit 70% Ethanol in Lösung gebracht. Die resultierenden optischen Dichten in Kulturen exponierter Zellen werden gegen die klare Lösung als Blindwert am Spektralphotometer vermessen und sind schließlich ein Maß für die Zahl verbleibender Zellen. In Vorversuchen wurde der Bereich für einen linearen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der eingesetzten Zellzahl ermittelt.

3.2.3.1 Aufbau und Ablauf Kristallviolett-Test

Für den Kristallviolett-Test und die Bestimmung der Apoptose wurden parallel die gleiche Zellkultur und dieselben Expositionslösungen verwendet. Zellen aus der Routinekultur wurden mit dem Zellschaber in 5 ml PBS-EDTA vorsichtig vom Flaschenboden abgeschabt und mit weiteren 10ml Medium als Zellsuspension in einem Falconröhrchen geerntet. Anschließend wurden die Zellen bei 1100 U/min für 5min zentrifugiert (Hettichzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in etwa 30ml frischem Medium aufgenommen. Mit einem Aliquot daraus wurde die Zahl der Zellen nach der Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

Der Test selbst wurde in Mikrotiterplatten (96 Well) durchgeführt. Die Zellzahl wurde auf 10000 vitale Zellen pro ml eingestellt und davon wurden 200µl mit 2000 Zellen pro Well pipettiert. Für jede Konzentration der Testsubstanz wurden in jedem

Experiment parallel Zellen in 4 Wells (Replikate) ausgesät. Die Vorbereitung der entsprechenden Lösungen ist oben (Kapitel 3.2.2) beschrieben.

Die Zellkulturen wurden zunächst 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde dieses Medium verworfen, und die Zellkulturen wurden für eine Stunde mit 100 µl Medium mit MAPK-Inhibitoren in zwei Konzentrationen, 10mM N-Acetylcystein (NAC) oder mit Medium ohne weitere Zusätze inkubiert. Optimale Konzentrationen der MAPK-Inhibitoren waren mit 10µM und 30µM für den MEK1/2-Inhibitor PD98059, 3µM und 10µM für den JNK-Inhibitor SP600125 sowie 10µM und 30µM für den p38-Inhibitor SB203580 in Vorversuchen ermittelt worden. Schließlich wurden die Zellen 200 µl Medium mit HEMA (0,1,4,6 oder 8 mM) mit oder ohne PD98059 (10µM oder 30µM), SP600125 (3µM oder 10µM), SB203580 (10µM oder 30µM) oder 10 mM NAC für 24h bei 37°C und 5% CO₂ exponiert. Als Positivkontrolle wurde 0,05µM Camptothecin verwendet. Sämtliche Experimente wurden zusätzlich mit oder ohne 0,1µg/ml LPS durchgeführt.

3.2.3.2 Fixierung der Zellkulturen

Eine visuelle Überprüfung des Zellwachstums in den einzelnen Wells wurde am Mikroskop vor der Fixierung durchgeführt. Danach wurden die Medien verworfen. Die Zellkulturen wurden mit 100 µl kalter 1%igen Glutardialdehyd-Lösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurde die Glutardialdehyd-Lösung verworfen, die Zellen wurden zweimal mit raumtemperiertem 1xPBS-EDTA gewaschen und in einer zweiten PBS-EDTA-Waschlösung im Kühlschrank mit Parafilm abgedichtet bis zum Färbetermin aufbewahrt.

3.2.3.3 Kristallviolettffärbung

Für die Kristallviolettffärbung wurde das PBS-EDTA abgekippt und jedes Well mit 150µl 0,02%iger Kristallviolett-Lösung für den 15-minütigen Färbevorgang versehen. Anschließend wurden die Färbelösungen abgekippt, die Mikrotiterplatten mit Leitungswasser gewaschen und zum Abfließen des Restwassers umgedreht auf saugfähiges Papier gelegt. In die angetrockneten Wells wurden je 180 µl 70%iges Ethanol gegeben, das innerhalb der nachfolgenden drei Stunden auf dem Schüttler GFL 3018 bei 100 Upm das an den Zellen verbliebene Kristallviolett löste.

3.2.3.4 Photometrische Messung

Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit dem TECAN Spektralphotometer (Infinite F200, TECAN GmbH, Männedorf, Schweiz).

3.2.3.5 Auswertung und Statistik

Die in unbehandelten Zellkulturen gemessenen optischen Dichten wurden normiert (=100%) und optische Dichten in Kulturen, die Testsubstanzen exponiert waren, wurden darauf bezogen. Die jeweils vier Einzelwerte für jede experimentelle Bedingung aus jeweils vier unabhängigen Experimenten (n=16) wurden zu Medianen (plus 25% und 75% Perzentilen) zusammengefasst. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden in paarweisen Vergleichen die Mediane statistisch analysiert und signifikante Unterschiede ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS (SPSS, Vers. 18.0 SPSS, Chicago, IL, USA), die graphische Darstellung mit SigmaPlot (8.0, Systat Software, San Jose, CA, USA).

3.2.4 Bestimmung der HEMA-induzierten Apoptose

Die HEMA-induzierte Apoptose wurde auf der Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie nach dem Färben exponierter Zellen mit Annexin-FITC oder Propidiumiodid (PI) bestimmt (Vermes *et al.*, 1995). Als Kontrollsubstanzen wurden Lipopolysaccharid (0,1 µg/ml) und Camptothecin (0,05 µM) eingesetzt. Zur Abschätzung der Funktion der MAPK wurden auch hier die pharmakologischen Inhibitoren PD98059 (Inhibitor von MEK1/2), SB203580 (Inhibitor von p38) und SP600125 (Inhibitor von JNK1-3) verwendet.

3.2.4.1 Aussaat der Zellen

RAW264.7 Mausmakrophagen aus der Routinekultur wurden nach Standardverfahren geerntet. Danach wurden 50.000 Zellen pro Well in 3 ml Zellkulturmedium auf einer 6-Well-Plate für 48 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert.

3.2.4.2 Versuchsdurchführung

Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden in 2 ml Medium mit oder ohne PD98059 (10µM oder 30µM), SP600125 (3µM oder 10µM), SB203580 (10µM oder 30µM) für 1h oder mit 10 mM NAC für 24h bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Danach wurden diese Medien wieder entfernt und die Zellen wurden nun 2 ml Medium mit HEMA (0,1,4,6, oder 8 mM) mit oder ohne PD98059 (10µM oder 30µM), SP600125 (3µM oder 10µM), SB203580 (10µM oder 30µM) oder 10 mM NAC für 24h bei 37°C und 5% CO₂ exponiert.

3.2.4.3 Zellernte

Es wurden adhärenente und nicht adhärenente (*floating*) Zellen geerntet. Dazu wurde zunächst das Expositionsmedium in einem FACS-Tube gesammelt. Dann wurde in jedes Well 250µl 5mM PBS-EDTA pipettiert, und die Platten wurden für 10min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Zellrasen mit 1ml des entsprechenden Überstandes aus dem FACS-Tube im Well gut abgespült ohne dass ein Schaben notwendig wurde. Diese Zellsuspension jedes Wells wurde nun in die beschrifteten FACS-Tubes zu den Überständen pipettiert und auf Eis gestellt. Die FACS-Tubes wurden dann bei 600xg bei 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml kaltem FACS-Puffer resuspendiert (Vortex-Mixer). Die Zellsuspension wurde erneut bei 600xg und 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen des Pellets wurden entsprechend des Färbeplans mit Annexin und Propidiumiodid gefärbt.

3.2.4.4 Darstellung von Zellen in Apoptose oder Nekrose

Hintergrund

Zellen aus HEMA- oder Kontrollsubstanzen-exponierten sowie unbehandelten Kulturen wurden mit Annexin und PI gefärbt. Dabei binden Zellen in Apoptose Annexin V, ein Protein, das spezifisch negativ geladene Phospholipide der Zellmembran markiert (Vermes *et al.*, 1995; Zhao, 2010). Für den Nachweis mittels Durchflusszytometrie ist Annexin mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Vitale Zellen besitzen eine asymmetrisch aufgebaute

Zellmembran mit Phosphatidylserin auf der inneren Oberfläche. Zellen in Apoptose verlieren diese Asymmetrie. Phosphatidylserin wird auch auf der äußeren Oberfläche zugänglich und mit Annexin detektiert. Neben Annexin wird Propidiumiodid (PI) verwendet. Dieser Farbstoff durchdringt die Zellmembran von Zellen in Nekrose und färbt DNA orange-rot, indem es in der doppelsträngigen DNA interkaliert.

Praktisches Vorgehen

PI (50µg/ml) wurde in Wasser verdünnt und 5µl davon wurden unmittelbar vor dem Messen mittels FACS zugegeben. Der Annexin-Mix wurde immer frisch hergestellt, der 1x Binding Buffer kann jedoch 2-3 Tage nach Lagerung bei 4°C verwendet werden. Pro Probe werden 1µl Annexin (MBL-Kit BV-K101-3) und 1x Binding Buffer verwendet (MBL-Kit: BV-K101-3). Nach Färbepplan für Proben, die mit Annexin, PI oder Annexin+PI gefärbt werden sollen, wurden 100µl des entsprechenden Färbemixes zu den Zellen pipettiert. Ungefärbte Proben erhielten 100µl 1x Binding Buffer (Blank-Mix). Sobald der Färbepvorgang begann, wurden die Proben möglichst lichtgeschützt behandelt.

3.2.4.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine Methode, mit der Zellen mittels eines anregenden Laserlichts in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften über Fluoreszenzmessungen und physikalische Streulichteigenschaften differenziert werden können. Dafür müssen die Zellen als Einzelzellsuspension vorliegen (Hawley *et al.*, 2004). Es ist eine sehr schnelle und präzise Technik, Zellreaktionen zu quantifizieren, die durch Fluoreszenzmarkierung von intrazellulären Metaboliten, Oberflächenmarkerproteinen, intrazellulären Proteinen oder anderen Makromolekülen wie DNA nachgewiesen werden können. Die Durchflusszytometrie wurde hier für die Quantifizierung vitaler Zellen oder von Zellen in Apoptose oder Nekrose verwendet (siehe unten).

3.2.4.6 Messprinzip der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer besteht zum einen aus einer mechanischen Komponente, bei der die Zellsuspension mit Druck durch eine trichterartige Verengung

beschleunigt wird. In der Messkanüle treffen sich zwei Flüssigkeitsströme, der Probenstrom und der aus entgastem Wasser bestehende Hüllstrom. Durch den höheren Druck des äußeren Hüllstroms (*sheath*) wird der innere Probenstrom zu einem dünnen Faden ausgezogen, es entsteht eine laminare Strömung, mit der die Partikel zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf die Messstelle zugeführt werden. Man spricht von hydrodynamischer Fokussierung. Die Zellen werden auf diese Weise, wie in einer Perlenkette aufgereiht, im rechten Winkel und durch die optimale Fokussierungsebene zum Laserstrahl, von einem oder mehreren Lasern der optischen Einheit einzeln erfasst.

Dieser Laser regt die mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen an, was wiederum von der elektronischen Komponente, dem Detektionssystem erfasst wird. Die Signalverarbeitung erfolgt über Photomultiplier, die über ein System aus optischen Linsen als Farbteiler, dichroitischen Spiegeln, Langpass- und Bandpassfilter das gestreute Licht und die Fluoreszenz erfassen. Es werden die Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) und spezifisch für die Apoptose-Messungen hier zwei Fluoreszenzen, FITC Fluoreszenz (FL-1) mit einem 530/30 Bandpassfilter, und PI Fluoreszenz (FL-3) durch einen 650 nm Langpassfilter gemessen. Dabei ist FSC ein Hinweis auf die Größe der vermessenen Zellen, SSC wiederum entspricht der Granularität der Zellen. Die vom Laserlicht angeregten Fluorochrome emittieren Licht mit charakteristischer Wellenlänge, welches vom „detektor array“ erfasst und dann in die spektralen Komponenten zerlegt wird (Sack *et al.*, 2007).

Beim hier verwendeten BD FACS Canto System kommt ein Helium-Neon Laser 633nm und ein Coherent Sapphire Laser 488nm mit sechs Kanälen (FL1-6) zum Einsatz. Nachgeschaltete Verstärker und Umwandler erstellen ein digitales Messsignal, das mittels Softwareprogramm „FACS Diva V“ dargestellt und ausgewertet wird

(<http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/Medizin/Pathologie/pdf/CantoManual.pdf>).

3.2.4.7 Einstellung der Geräteparameter

Die Intensität des Vorwärtsstreulichtes (FSC = *forward scatter*) gibt Auskunft über die Größe der Zellen, so dass man mit Hilfe dieses Parameters eine Größendiskriminierung vornehmen kann. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side*

scatter) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert. Das SSC-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die zugehörigen Signale eignen sich zur Diskriminierung von Zelldebris und zur Unterscheidung von Zelltypen und Zellgröße. Zuerst muss ein Schwellenwert festgelegt werden, ab welcher Signalstärke ein Partikel gemessen wird. Dabei soll bei einer Auftragung von FSC gegen SSC die Zellpopulation vollständig erfasst und Zelldebris von der Messung ausgeschlossen werden. Außerdem findet man auch nach sorgfältiger Zellvereinzelung während des Messvorgangs immer wieder Zelldubletten und größere Zellaggregate. Diese sollen erkannt und vor der Datenauswertung diskriminiert werden.

Mit Dot Plots können zwei unterschiedliche Parameter, etwa FSC und SSC, dargestellt werden. Dies ermöglicht - je nach Auswahl der gegenübergestellten Parameter - einen Überblick über die vermessenen Zellen, die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen, sowie die Diskriminierung unerwünschter Partikel (beispielsweise Zelldebris). Die Auswahl der Eliminierung erfolgt dabei über ein *Gating*. Ein Feld innerhalb des Dot Plots wird markiert, welches beispielsweise Zelldubletten oder Zellbruchstücke (*debris*) aus-, die gewünschten Zellen jedoch einschließt. Für die Quantifizierung des gewünschten Ereignisses, etwa die Bestimmung der Zahl der Zellen in Apoptose oder Nekrose, werden nur diejenigen Zellen berücksichtigt, die sich innerhalb des *gates* befinden.

Jede Zelle, die mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, zeigt auch ohne spezifische Fluoreszenzfärbung aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften eine gewisse Autofluoreszenz in allen Kanälen. Aus diesem Grund wird immer eine ungefärbte Probe als negative Kontrolle mitgeführt und der höchste Wert bestimmt, in den die Autofluoreszenz einer negativen Zelle fallen kann. Dieser Wert wird für alle folgenden Messungen beibehalten, so dass jede fluoreszenzgefärbte Zelle mit einem höheren Wert als positiv betrachtet werden kann (Robinson, 1993; Genzlinger, 1999).

3.2.4.8 Darstellung der Messdaten

Eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge angeregt werden, aber unterschiedliche charakteristische Emissionsspektren besitzen. Die

Zellen in der vorliegenden Untersuchung wurden mit FITC-Annexin und Propidiumiodid PI gefärbt. FITC-Fluoreszenz (FL-1) wurde durch einen 530/30 Bandpassfilter, und die PI Fluoreszenz (FL-3) durch einen 650 nm Langpassfilter erfasst.

Lebende Zellen (Annexin V-; PI-) wurden im unteren linken Quadrant eines Density Plots dargestellt (Q3), Zellen in Apoptose (Annexin V+; PI-) wurden im unteren rechten Quadrant (Q4) detektiert, und Zellen in später Apoptose (Annexin V+; PI+) wurden im oberen rechten Quadrant (Q2), Zellen in Nekrose (Annexin V-; PI+) im oberen linken Quadrant (Q1) nachgewiesen. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 2) ist dieses Prinzip anhand eines repräsentativen Beispiels an zwei Zellkulturen gezeigt. Zum einen betrug der Anteil vitaler Zellen, die weder mit FITC-Annexin noch mit PI gefärbt wurden, fast 95% und der Anteil der Zellen in Apoptose, die FITC-Annexin detektiert wurden, war entsprechend gering (0,8%) (Abb. 2A). Umgekehrt sank die Zahl vitaler Zellen in Kulturen, die für 24 Stunden 0,05 μ M Camptothecin exponiert wurden auf etwa 53% und der Anteil der Zellen in Apoptose stieg auf 11% (Abb. 2B).

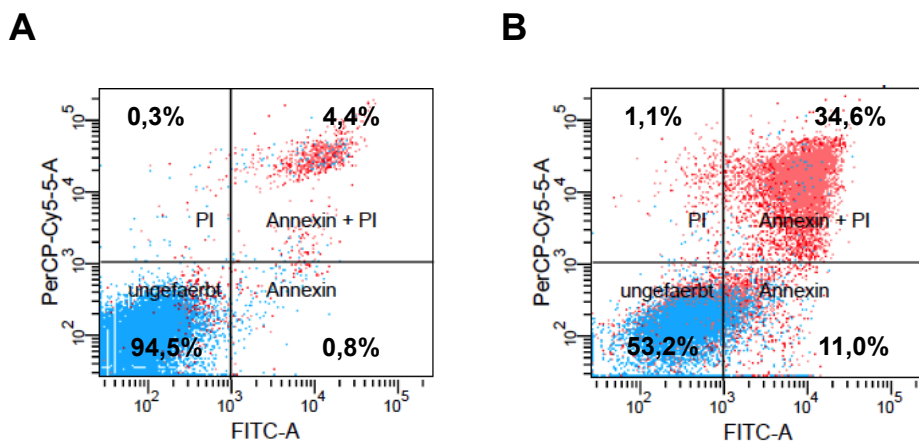


Abb.2: Graphische Darstellung von Zellen in Apoptose nach FACS-Analysen. Die beiden Beispiele zeigen unbehandelte Zellkulturen (A) und Zellen, die mit 0,05 μ M Camptothecin (B) behandelt sowie mit Annexin V (FITC-A) und Propidiumiodid (PerCP-Cy5-5-A) gefärbt wurden. Der Prozentsatz lebender Zellen (Annexin V-; PI-) wurde im unteren linken Quadranten eines Density Plots als ungefärbt dargestellt, der Teil der Zellen in Apoptose (Annexin V+; PI-) erscheint im unteren rechten Quadrant, der Teil der Zellen in später Apoptose (Annexin V+; PI+) ist im oberen rechten Quadranten gezeigt und die Zahl der Zellen in Nekrose (Annexin V-; PI+) ist im oberen linken Quadranten präsentiert.

3.2.4.9 Auswertung und Statistik

Einzelwerte für die jeweils zu erfassenden Parameter aus mindestens vier unabhängigen Versuchen wurden für unbehandelte und behandelte Zellkulturen zu Medianen sowie 25%- und 75%-Perzentilen zusammengefasst. Unterschiede zwischen den Medianen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Signifikanztest (*SPSS, Vers. 18.0 SPSS*, Chicago, IL, USA) errechnet und p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Mediane sowie 25% und 75% Perzentile wurden graphisch dargestellt (*SigmaPlot 8.0*, Systat Software, San Jose, CA, USA).

4 Ergebnisse

In den Analysen zur Erklärung der möglichen Funktion von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) für die Induktion von Apoptose durch das dentale Monomer HEMA wurden RAW264.7 Mausmakrophagen als Modell für Reaktionen des zellulären Immunsystems verwendet. Hinweise auf die Bedeutung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK sollten hier vor allem mit der Verwendung spezifischer pharmakologischer Inhibitoren erzielt werden (Krifka *et al.*, 2012a). Die Untersuchungen wurden auch in Anwesenheit des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid durchgeführt, weil bekannt war, dass LPS die Aktivität von MAPK stimuliert (Raetz und Whitfield, 2002). Camptothecin erzeugt in eukaryontischen Zellen Apoptose und wurde deshalb hier als Kontrollsubstanz in jedem einzelnen Experiment geprüft. Mit der Verwendung des Antioxidans N-Acetylcystein sollte die Bedeutung von oxidativem Stress für die HEMA-induzierte Apoptose geprüft werden. Optimale Konzentrationen für LPS, Camptothecin, NAC sowie für die Inhibitoren PD98059 (MEK1/2-Inhibitor), SB203580 (p38-Inhibitor) und SP600125 (JNK-Inhibitor) wurden in Vorversuchen unter ansonsten identischen experimentellen Bedingungen ermittelt (nicht dargestellt). Vor den Experimenten zur Bestimmung der Anteile von Zellen in den verschiedenen Stadien des Zelltods (Apoptose und Nekrose) nach Färbung mit Annexin und PI mittels FACS wurde separat davon die Zahl überlebender Zellen (Zytotoxizität) in den mit HEMA behandelten Kulturen mittels Färbung mit Kristallviolett ermittelt (Flick und Gifford, 1984; Vermes *et al.*, 1995; Durner *et al.*, 2010; Van Landuyt *et al.*, 2011).

4.1 Zytotoxizität von HEMA in Mausmakrophagen

4.1.1 Zytotoxizität von HEMA nach Inhibition der MAPK ERK1/2

Die Ergebnisse des Kristallviolett-Tests zeigen, dass steigende Konzentrationen von HEMA die Zahl überlebender Zellen reduzieren (Abb. 3). Von etwa 99% der Zellen in unbehandelten Kontrollen sinkt die Anzahl überlebender Zellen mit steigender HEMA Konzentration bis auf etwa 30% bei 8 mM HEMA. Die Zugabe von 0,1µg/ml LPS allein zeigt eine Abnahme der Zellzahl auf ca. 70%. Bei der höchsten HEMA Konzentration von 8mM zeigt sich in Anwesenheit von LPS ein etwas höheres

Zellüberleben von etwa 46% im Vergleich zu den Ergebnissen ohne LPS (Abb. 3).

Die Zugabe von PD98059 allein, ein pharmakologischer Inhibitor der MAPK Kinase MEK1/2 (Scholl *et al.*, 2007), die ERK1/2 durch Phosphorylierung aktiviert, führt zu einer Abnahme der Zellzahl auf 65% mit 10 μ M PD98059 und auf etwa 50% mit 30 μ M PD98059. LPS alleine reduziert zwar die Zahl überlebender Zellen, ein Einfluss des MEK-Inhibitors auf die Wirksamkeit von LPS alleine und HEMA/LPS ist jedoch nicht erkennbar. Jedoch sind hohe HEMA-Konzentrationen in Gegenwart von LPS signifikant weniger effektiv.

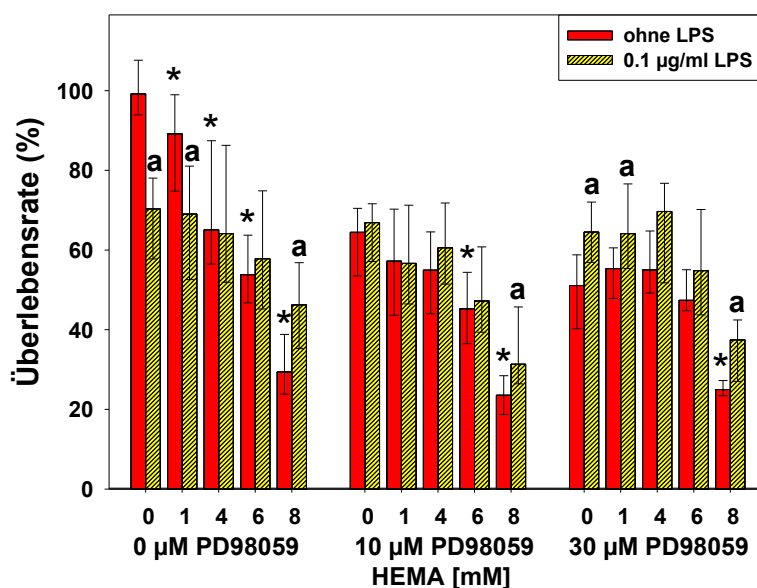


Abb. 3: Die Zytotoxizität von HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen unter dem Einfluss des MEK1/2-Inhibitors PD98059. Die Zellen wurden HEMA Konzentrationen von 0-1-4-6-8 mM mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h exponiert. Die Zahl überlebender Zellen wurde nach photometrischen Messungen und Färbung mit Kristallviolett errechnet. Die Balken zeigen die Prozentsätze überlebender Zellen als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus jeweils 4 Replikaten in vier unabhängigen Experimenten (n=16). * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA und 0 μ M PD98059, 10 μ M PD98059 oder 30 μ M PD98059 behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.1.2 Zytotoxizität von HEMA nach Inhibition der MAPK p38

Der p38 Inhibitor SB203580 alleine bewirkt nur eine geringe Abnahme der Zahl überlebender Zellen. Mit einer hohen Inhibitorkonzentration von 30 μ M bleibt die Zellzahl bei etwa 89% derjenigen in unbehandelten Kontrollen (Abb. 4). In den Versuchen mit HEMA, das die Zellzahl konzentrationsabhängig reduziert, zeigen sich keine signifikanten Abweichungen durch den Inhibitor. SB203580 hemmt jedoch die

Wirksamkeit von LPS, denn die Zahl der Zellen steigt von 62% ohne SB203580 auf 76% mit 30 μ M SB203580 (Abb.4). Der Einfluß von LPS auf den Effekt von HEMA bleibt jedoch gleich (Abb.4).

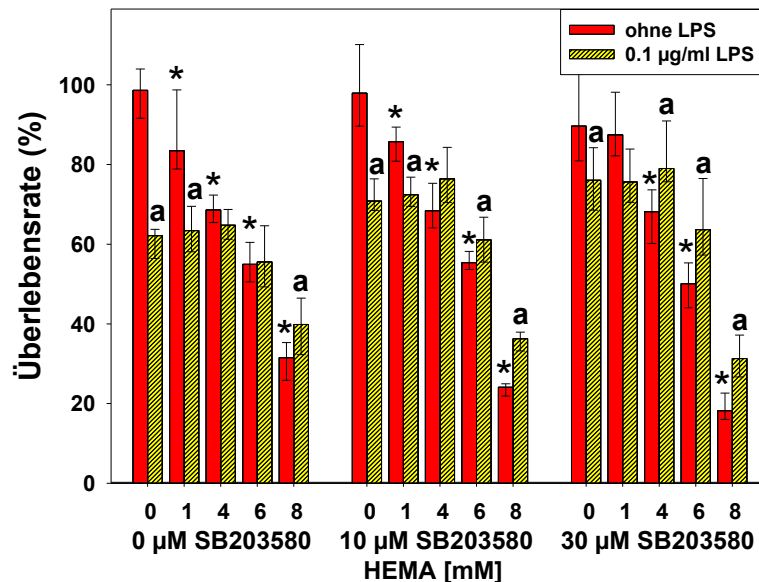


Abb. 4: Die Zytotoxizität von HEMA in RAW264.7 Mausmakrophagen unter dem Einfluss des p38-Inhibitors SB203580. Die Zellen wurden HEMA Konzentrationen von 0-1-4-6-8 mM mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h exponiert. Die Zahl überlebender Zellen wurde nach photometrischen Messungen und Färbung mit Kristallviolett errechnet. Die Balken zeigen die Prozentsätze überlebender Zellen zusammengefasst als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus jeweils 4 Replikaten in vier unabhängigen Experimenten (n=16).

* = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA und 0 μ M SB203580, 10 μ M SB203580 oder 30 μ M SB203580 behandelt wurden;
a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.1.3 Zytotoxizität von HEMA nach Inhibition der MAPK JNK

Der Einfluss des JNK Inhibitors SP600125 auf die Zellen äußert sich in einer Abnahme der Zellzahl auf annähernd 60% durch 10 μ M SP600125 verglichen mit unbehandelten Kulturen (Abb. 5). In den Versuchen mit HEMA zeigen sich keine signifikanten Abweichungen durch den Inhibitor. Außerdem wurde wie zuvor mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 auch mit SP600125 kein Einfluss auf die Wirkung von LPS beobachtet (Abb. 5).

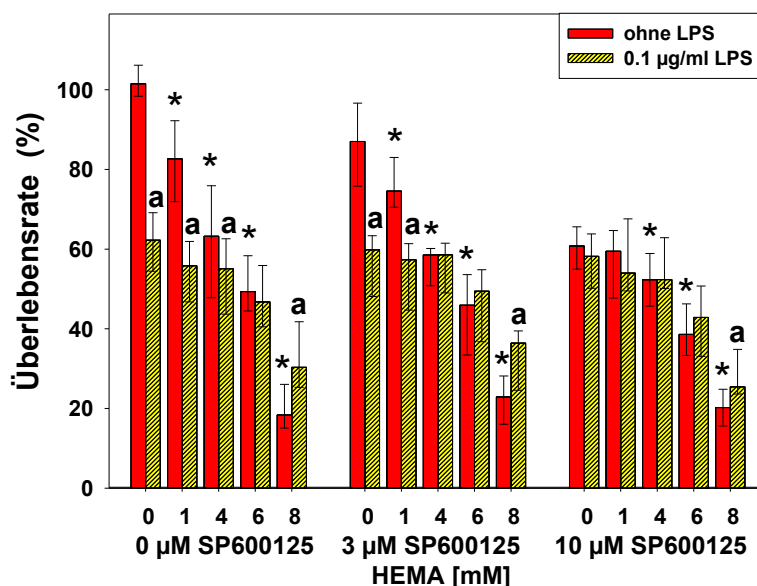


Abb. 5: Die Zytotoxizität von HEMA in RAW264.7 Mausmakrophagen unter dem Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125. Die Zellen wurden HEMA Konzentrationen von 0-1-4-6-8 mM mit und ohne LPS (0.1 µg/ml) für 24 h exponiert. Die Zahl überlebender Zellen wurde nach photometrischen Messungen und Färbung mit Kristallviolett errechnet. Die Balken zeigen die Prozentsätze überlebender Zellen zusammengefasst als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus jeweils 4 Replikaten in vier unabhängigen Experimenten (n=16).

* = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA und 0 µM SP600125, 3 µM SP600125 oder 10 µM SP600125 behandelt wurden;
a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.1.4 Zytotoxizität von Camptothecin in Anwesenheit von MAPK Inhibitoren

Camptothecin (0,05 µM) reduziert die Zellzahl auf 40-50% und in Gegenwart von 0,1 µg/ml LPS sinkt die Zahl der Zellen auf etwa 60-70% verglichen mit unbehandelten Kulturen (Abb. 6 A-C). Der Einfluss von LPS auf die Wirkung von Camptothecin ist gering und nicht immer statistisch signifikant (Abb. 6 A-C).

Bei Einsatz des MEK1/2 Inhibitors PD98059 ist mit steigender Konzentration ein starker Abfall der Zellzahl erkennbar. Mit 30µM PD98059 sind nur noch etwa die Hälfte der Zellen nachweisbar und Camptothecin reduziert die Zellzahl noch mehr (17%). LPS scheint diesem Effekt entgegenzuwirken, weil in Gegenwart von LPS wieder 49% überlebende Zellen zu finden sind. Der Einfluss von LPS auf die Wirkung von Camptothecin ist jedoch unabhängig von ERK1/2, aber auch unabhängig von SB203580 und SP600125, den Inhibitoren von MAPK p38 und JNK (Abb. 6 A-C).

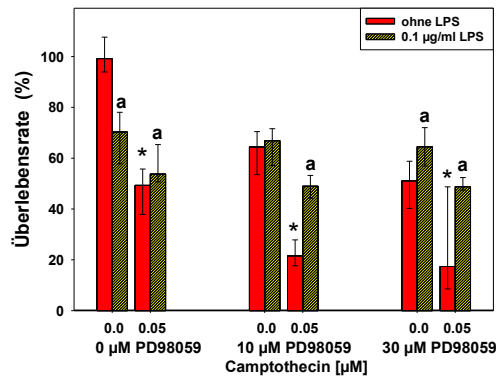
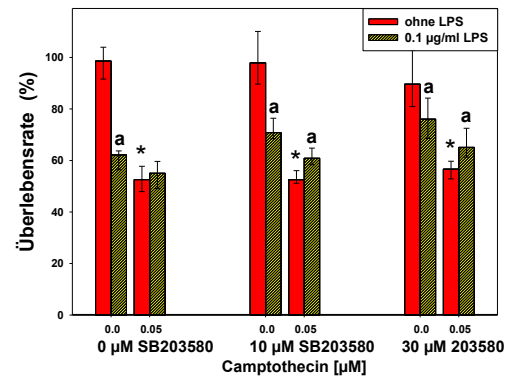
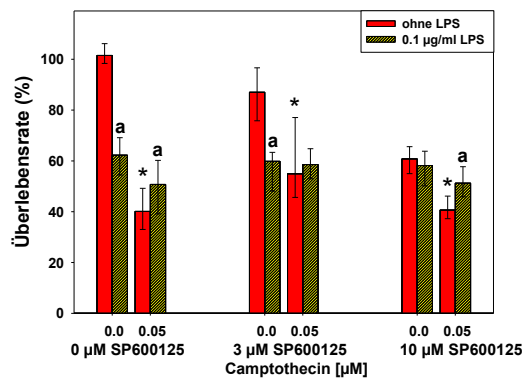
A**B****C**

Abb. 6: Die Zytotoxizität von Camptothecin in RAW264.7 Mausemakrophagen unter dem Einfluss der MAPK-Inhibitoren PD98059 (A), SB203580 (B) und SP600125 (C). Die Zellen wurden 0.05 µM Camptothecin mit oder ohne LPS (0.1 µg/ml) für 24 h exponiert. Die Zahl überlebender Zellen wurde nach photometrischen Messungen und Färbung mit Kristallviolett errechnet. Die Balken zeigen die Prozentsätze überlebender Zellen zusammengefasst als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus jeweils 4 Replikaten in vier unabhängigen Experimenten (n=16). * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM Camptothecin und 0 µM, 3 µM oder 10 µM SP600125 oder aber 10 und 30 µM PD98059 oder SB203580 behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

Der Kristallviolett-Test mit dem p38 Inhibitor SB203580 zeigt keine signifikante Veränderung der Zellzahl bei alleiniger Zugabe des Inhibitors (Abb. 6 B). Bei der hohen Konzentration von 30 µM überleben, wie auch oben beschrieben (vgl. Abb. 4) immer noch ungefähr 90% der Zellen. Mit Camptothecin überleben etwa 50% der Zellen, wobei auch hier kein Einfluss des Inhibitors zu beobachten ist. SB203580 reduziert die Wirkung von LPS, denn die Zellzahl steigt auf etwa 76% in Gegenwart von 30 µM SB203580 verglichen mit Kulturen, die nur LPS exponiert sind. Dieser protektive Effekt ist auch in den Ansätzen mit Camptothecin erkennbar (Abb. 6 B).

Der JNK Inhibitor SP600125 reduziert die Zellzahl auf 60% und weiter auf 40% bei 10 μ M in Gegenwart von Camptothecin (Abb. 6 C). Die Anwesenheit von LPS schützt die Zellen vor der Zytotoxizität von Camptothecin, es überlebten ca. 10% mehr als ohne.

4.2 HEMA-induzierte Apoptose in Mausemakrophagen

Die Bestimmung der Apoptose fand wie in Kapitel 3.2.4.8 beschrieben statt. Die Abbildung dort repräsentiert die ermittelten FACS-Daten und erklärt das Prinzip der Auswertung. Unbehandelte Zellkulturen und solche, die HEMA, LPS oder Camptothecin exponiert waren, wurden mit Annexin und PI gefärbt und mit dem Durchflusszytometer vermessen. Mit der adäquaten Software können in einem Density Plot vier verschiedene Zellpopulationen dargestellt werden. Eine Population ungefärbter vitaler Zellen (Annexin V-/PI-), Annexin-gefärbte Zellen in Apoptose (Annexin V+/PI-), Annexin- und PI-gefärbte Zellen (Annexin V+/PI+) im Stadium der späten Apoptose sowie eine Population nur PI-gefärbter Zellen (Annexin V-/PI+) in Nekrose. Der Anteil der Zellen in diesen verschiedenen Populationen wird quantifiziert und graphisch präsentiert.

4.2.1. HEMA-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK ERK1/2

Der MEK1/2 Inhibitor PD98059, der die Wirkung der MAPK ERK1/2 hemmt, wirkt in der Konzentration von 30 μ M in den RAW 264.7 Mausemakrophagen. Die Zahl vitaler Zellen, sinkt auf 90% verglichen mit 96% in unbehandelten Kulturen (Abb. 7). Dieses Experiment zeigt, dass der Inhibitor in die Zellen gelangt, aber dort zytotoxisch wirkt. Für die Experimente mit dem Monomer HEMA wurde deshalb auch immer eine geringe, nicht so zytotoxische Inhibitorkonzentration von 10 μ M verwendet. Mit steigenden Konzentrationen von HEMA sinkt die Zahl vitaler Zellen bis auf etwa 65% mit 8 mM HEMA. Mit derselben HEMA-Konzentration steigt parallel dazu vor allem die Zahl der Zellen in der späten Apoptose auf etwa 32%. LPS alleine reduziert die Zellvitalität auf 72% und in Gegenwart von PD98059 konzentrationsabhängig noch weiter auf 59% (10 μ M PD98059) und 54% (30 μ M PD98059). Wiederum steigt parallel dazu die Zahl der Zellen in später Apoptose. Der ERK1/2-Signalweg wirkt also der Zytotoxizität von LPS entgegen.

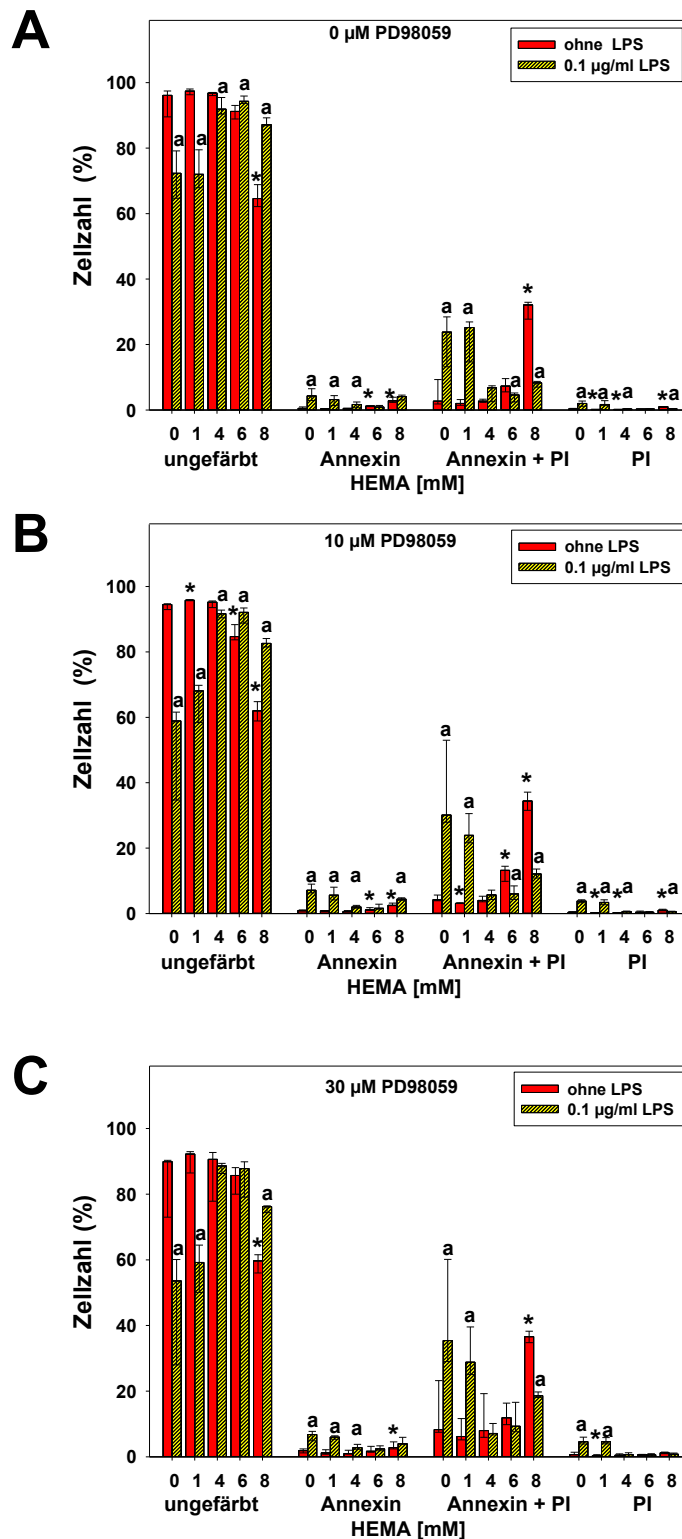


Abb. 7: Die Induktion von Apoptose durch HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen in Experimenten mit dem MEK1/2-Inhibitor PD98059. Die Zellen wurden HEMA Konzentrationen von 0-1-4-6-8 mM mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (ungefärbt=vital), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin + PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier unabhängig ermittelten Experimenten (n=4). * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA und 0 μ M PD98059 (A), 10 μ M PD98059 (B) oder 30 μ M PD98059 (C) behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

PD98059 hat jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die Wirkung von HEMA. Bemerkenswert ist jedoch, dass sich anscheinend HEMA und LPS abhängig von der jeweiligen HEMA-Konzentration wechselweise in ihrer Wirkung beeinflussen. Zum einen scheinen 4-6 mM HEMA die Zellen gegen die zytotoxische Wirkung von LPS zu schützen. Zum anderen inhibiert LPS signifikant die zytotoxische Wirkung der hohen HEMA-Konzentrationen, vor allem diejenige von 8 mM HEMA. So steigt etwa in den mit 8 mM HEMA behandelten Kulturen die Zellvitalität von 65% signifikant auf etwa 87% in Anwesenheit von 0,1 µg/ml LPS. Parallel dazu sinkt die Zahl der Zellen in der späten Apoptose, nicht jedoch in den anderen Stadien des Zelltods. Ein Einfluss des MEK1/2 Inhibitors PD98059 auf diese Wechselwirkung ist hier nicht erkennbar.

4.2.2. HEMA-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK p38

Der Inhibitor SB203580 der p38 MAP-Kinase zeigt alleine keine signifikante Wirkung auf die Zellen, denn auch in den mit Konzentrationen von 10 µM oder 30 µM behandelten Kulturen ist eine ähnlich hohe Zellvitalität von etwa 95% nachweisbar (Abb. 8). Die Reaktionen in den steigenden HEMA-Konzentrationen exponierten Kulturen lassen keinen signifikanten Einfluss des Inhibitors erkennen. Die Zellvitalität sinkt mit oder ohne SB203580 durch die Zugabe von 8mM HEMA nicht signifikant verschieden auf etwa 62-68%. Die Wechselwirkung zwischen den Effekten von HEMA und LPS ist auch in diesen Experimenten unabhängig von der Anwesenheit des Inhibitors SB203580. Die MAP-Kinase p38 ist also möglicherweise nicht an der Regulation der durch HEMA verursachten Apoptose oder des Überlebens der Zellen beteiligt.

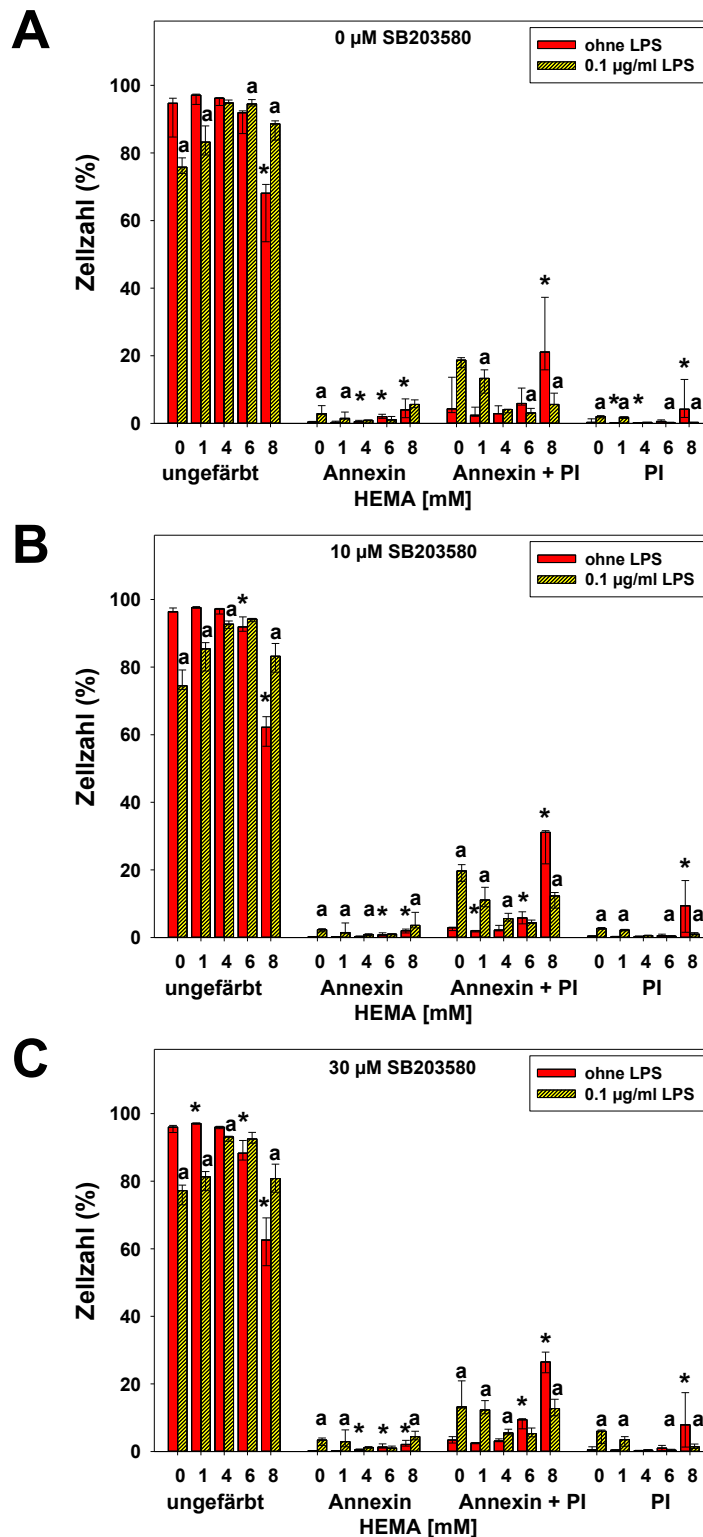


Abb. 8: Die Induktion von Apoptose durch HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen in Experimenten mit dem p38-Inhibitor SB203580. Die Zellen wurden HEMA-Konzentrationen von 0-1-4-6-8mM mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (ungefärbt=vital), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin + PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier unabhängig ermittelten Experimenten (n=4). * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA und 0 μ M SB203580 (A), 10 μ M SB203580 (B) oder 30 μ M SB203580 (C) behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.2.3. HEMA-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK JNK

In den unabhängigen Experimenten zur Analyse des Einflusses des JNK Inhibitors SP600125 auf die Wirkung von HEMA reduziert das Monomer die Zellvitalität wie oben beschrieben (vgl. 4.2.1). Steigende Konzentrationen des Inhibitors reduzieren die Zellvitalität von etwa 96% (0 μ M SP600125) auf 91% (10 μ M SP600125) (Abb. 9). Der Inhibitor wirkt also intrazellulär. Die Zellvitalität in den mit LPS behandelten Kulturen nimmt mit steigenden Konzentrationen von SP600125 von 77% (0 μ M SP600125) auf 47% (10 μ M SP600125) ab. Entsprechend geringer ist der protektive Effekt von LPS gegen die Wirkung von 8 mM HEMA. Steigt die Zellvitalität in den mit 8 mM HEMA behandelten Kulturen ohne SP600125 noch von 58% ohne LPS auf 86% mit LPS, so nimmt sie in den Ansätzen mit 10 μ M SP600125 nur noch von 56% auf 75% zu. Parallel dazu verändern sich die Zellzahlen der Population in der späten Apoptose. So könnte es also sein, dass der JNK MAP Kinaseweg der Zytotoxizität von LPS entgegenwirkt.

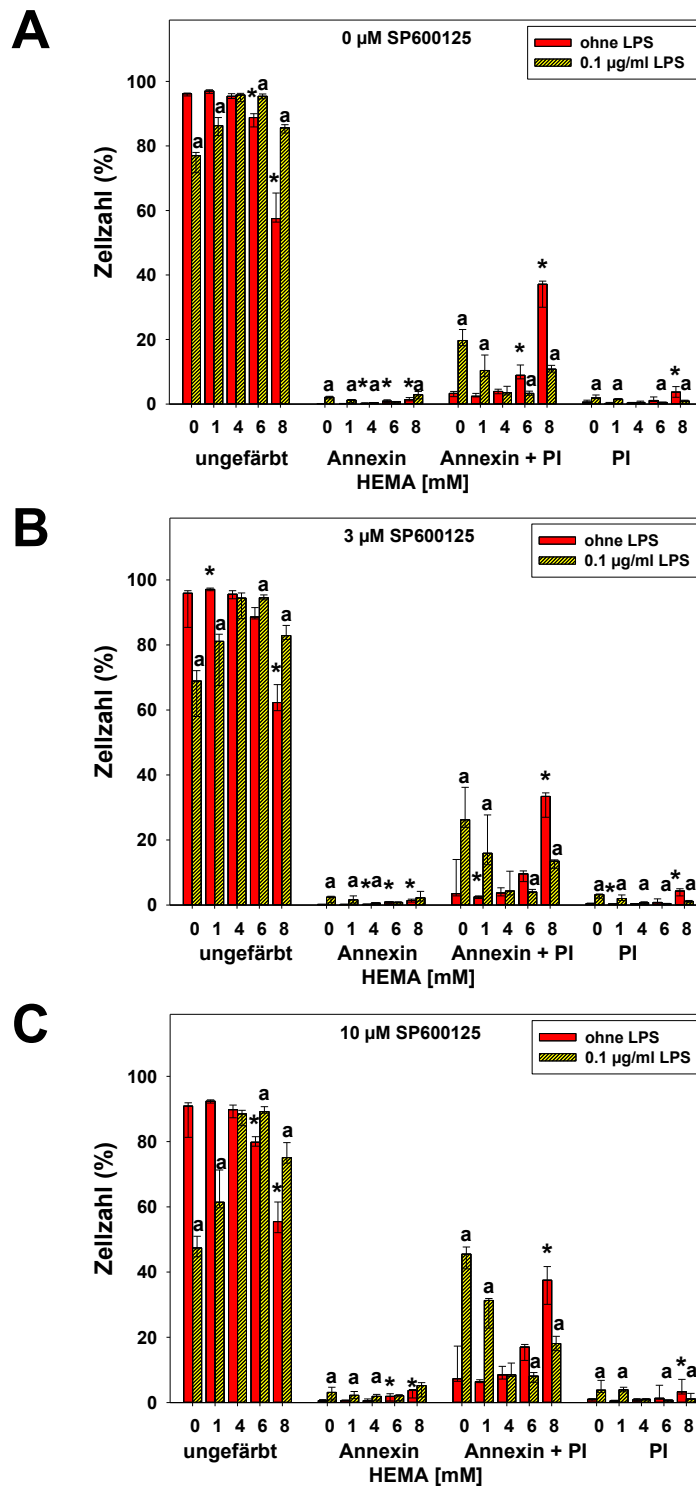


Abb. 9: Die Induktion von Apoptose durch HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen in Experimenten mit dem JNK-Inhibitor SP600125. Die Zellen wurden HEMA-Konzentrationen von 0-1-4-6-8mM mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (ungefärbt=vital), Zellen in Apoptose(Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin + PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier unabhängig ermittelten Experimenten (n=4). * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA und 0 μ M SP600125 (A), 3 μ M SP600125 (B) oder 10 μ M SP600125 (C) behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.2.4. HEMA-induzierte Apoptose in Anwesenheit von NAC

N-Acetylcystein (NAC), die acetylierte Form der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein, ist eine unmittelbare Vorstufe des Glutathions, dem nicht enzymatischen Hauptantioxidans der Zelle (Soheili Majd *et al.*, 2003). Hier sollte die schützende Wirkung von NAC in Verbindung mit LPS auf HEMA-exponierte Zellen untersucht werden. Aufgrund eigener Vorarbeiten wurde N-Acetylcystein (NAC) in der Konzentration 10 mmol/L eingesetzt (Krifka *et al.*, 2013). Wie oben beschrieben, reduzieren steigende Konzentrationen von HEMA die Zellvitalität. Sie sinkt in diesen Experimenten von 97% in unbehandelten Kulturen auf 58% in den 8mM HEMA exponierten Zellen (Abb. 10A). Mit NAC allerdings steigt die Vitalität in den mit 8 mM HEMA behandelten Zellen auf etwa 90%. Daraus kann die deutlich schützende Wirkung von NAC gefolgert werden.

Die Versuche mit LPS zeigen die bekannt toxische Wirkung von LPS mit einer schützenden Funktion der niedrigen HEMA-Konzentrationen (1 und 4 mM HEMA) (Abb. 10B). Umgekehrt kann man eine schützende Wirkung von LPS auf die Effekte der hohen HEMA-Konzentrationen beobachten (6 und 8 mM HEMA). NAC zeigt auch in den LPS-exponierten Zellen einen schützenden Effekt. So nimmt beispielsweise die Zellvitalität in den mit LPS behandelten Kulturen auf 65% ab, steigt aber mit NAC auf etwa 73%, oder in Kulturen mit LPS und 1 mM HEMA von 78% auf 94% in Gegenwart von NAC (Abb. 10B). Man darf annehmen, dass der zytotoxische Effekt von LPS zum Teil über ROS vermittelt wird. Die protektive Wirksamkeit geringer HEMA-Konzentrationen auf den Effekt von LPS wird verstärkt, wenn die Menge an ROS sinkt. Möglicherweise kann aber NAC andere Mechanismen aktivieren, die das Überleben von Zellen befördern. LPS schützt gegen die Wirkung hoher HEMA-Konzentrationen, denn die Zellvitalität steigt von 58% ohne LPS auf 86% mit LPS, mit NAC sogar noch weiter auf 95% und liegt damit noch höher als mit HEMA und NAC (ohne LPS) (Abb. 10B).

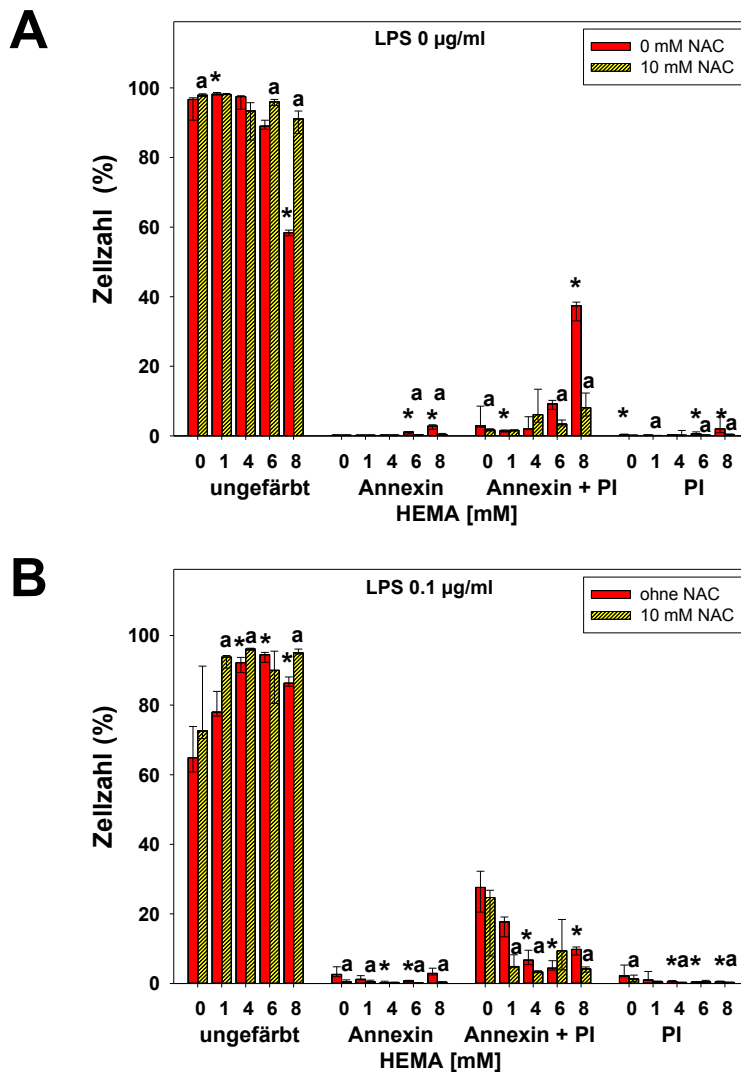


Abb. 10: Der Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) (10 mmol/L) auf die HEMA-induzierte Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen. Die Zellen wurden verschiedenen HEMA-Konzentrationen von 0-1-4-6-8mM jeweils mit oder ohne N-Acetylcystein (NAC) (10 mmol/L) und ohne (A) oder mit (B) LPS (0.1 µg/ml) für 24 h ausgesetzt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die mit Annexin V-FITC oder Propidiumiodid (PI) gefärbten Zellen vermessen und die Apoptose bestimmt. Die Balken zeigen lebende Zellen (ungefärbt=vital), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin + PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier unabhängig ermittelten Experimenten. * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 mM HEMA behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen NAC.

4.2.5. Induktion von Apoptose durch Camptothecin

Camptothecin ist ein zelltoxischer Wirkstoff, der hier als Kontrollsubstanz verwendet wird. In Vorversuchen mit steigenden Camptothecin-Konzentrationen, deren Ergebnisse hier nicht gezeigt sind, wurde eine Konzentration von 0,05µM Camptothecin als zytotoxisch ermittelt.

4.2.5.1 Camptothecin-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK MEK1/2

Camptothecin alleine reduziert die Zahl vitaler Zellen auf 54%, während in Anwesenheit von LPS alleine etwa 68% der Zellen vital bleiben (Abb. 11 A). In Kombination mit LPS zeigen die Zellen ein bemerkenswertes Ergebnis auf die Wirkung von Camptothecin, denn die Zahl vitaler Zellen bleibt bei 68% so hoch wie mit LPS alleine. Parallel dazu sinkt die Zahl der Zellen in der späten Apoptose (Annexin + PI) von 34% in den Kulturen, die Camptothecin exponiert sind auf 20% in Anwesenheit von LPS. LPS wirkt also hier der Zytotoxizität von Camptothecin entgegen und entfaltet eine schützende Wirkung. Die alleinige Wirkung von PD98059, ein Inhibitor der MAPK MEK1/2 und damit des ERK1/2 Signalwegs ist sehr gering. Während 10 μ M PD98059 die Vitalität der Zellen nicht verändern, reduzieren 30 μ M PD98059 die Zahl vitaler Zellen auf 90% verglichen mit 96% vitaler Zellen in unbehandelten Kulturen. In Anwesenheit von 10 μ M PD98059 sinkt die Vitalität in Kulturen, die Camptothecin exponiert werden auf etwa 22% verglichen mit 54% vitalen Zellen in Kulturen ohne PD98059. Die Zahl der Zellen in der späten Apoptose (Annexin + PI) steigt von 35% ohne PD98059 auf 63% (Abb. 11 B). Ein in der Qualität gleicher aber etwas stärkerer Effekt wird mit 30 μ M PD98059 beobachtet (Abb. 11 C). Der ERK-Signalweg wirkt also der Zytotoxizität von Camptothecin entgegen. Die Wirkung von PD98059 auf die Zytotoxizität von LPS ist weniger stark als mit Camptothecin. Mit LPS alleine erhält man etwa 68% vitale Zellen und diese Zahl sinkt auf 59% in Anwesenheit von 10 μ M PD98059 und auf 46% mit 30 μ M PD98059 (Abb. 11 B und C). Der ERK-Signalweg wirkt also auch der Zytotoxizität von LPS entgegen. Bemerkenswert ist hier, dass die protektive Wirkung von LPS gegen die Zytotoxizität von Camptothecin nicht von PD98059 beeinflusst ist, der protektive Effekt also über einen anderen Signalweg erfolgen wird.

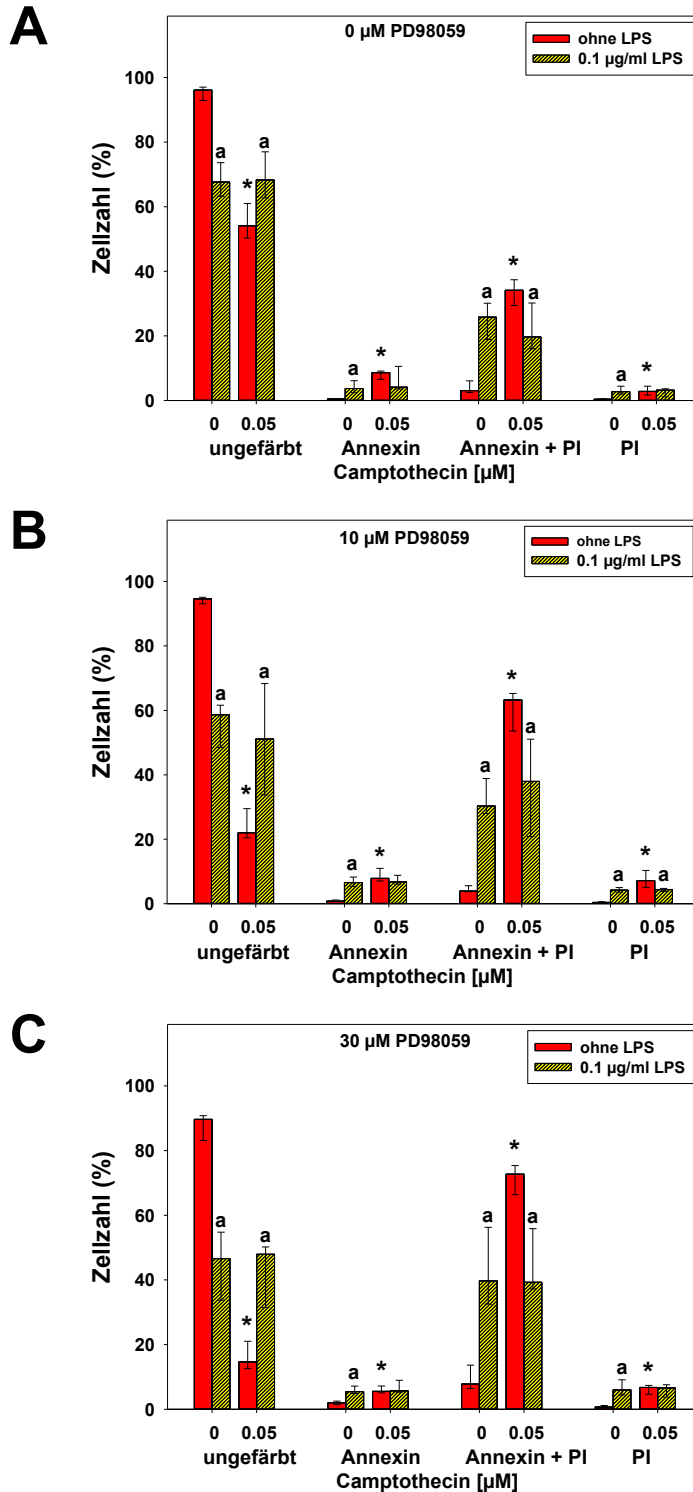


Abb. 11: Der Einfluss des MEK Inhibitors PD98059 auf die Apoptose in RAW264.7 Mausmakrophagen mit Camptothecin. Die Zellen wurden Camptothecin (0,05 μ M) mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (ungefärbt), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin+PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier (n=4) unabhängigen Experimenten. * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 μ M Camptothecin und 0 μ M (A), 10 μ M (B) oder 30 μ M PD98059 (C) behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.2.5.2 Camptothecin-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK p38

Wie erwartet, sinkt die Zahl vitaler Zellen in Kulturen, die Camptothecin oder LPS exponiert werden, und LPS schützt die Zellen vor der Zytotoxizität des Camptothecin (Abb. 12 A). Der p38 Inhibitor SB203580 alleine entwickelt in den hier geprüften Konzentrationen keine Wirkung auf die Zellvitalität. Auch wenn in Anwesenheit von 10 μ M SB203580 die Zahl vitaler Zellen, die Camptothecin exponiert werden verglichen mit Kontrollkulturen sinkt, und umgekehrt 30 μ M SB203580 die Zahl vitaler Zellen verglichen mit den Ansätzen ohne SB203580 erhöht, sind diese Unterschiede nicht signifikant (Abb. 12 B und C).

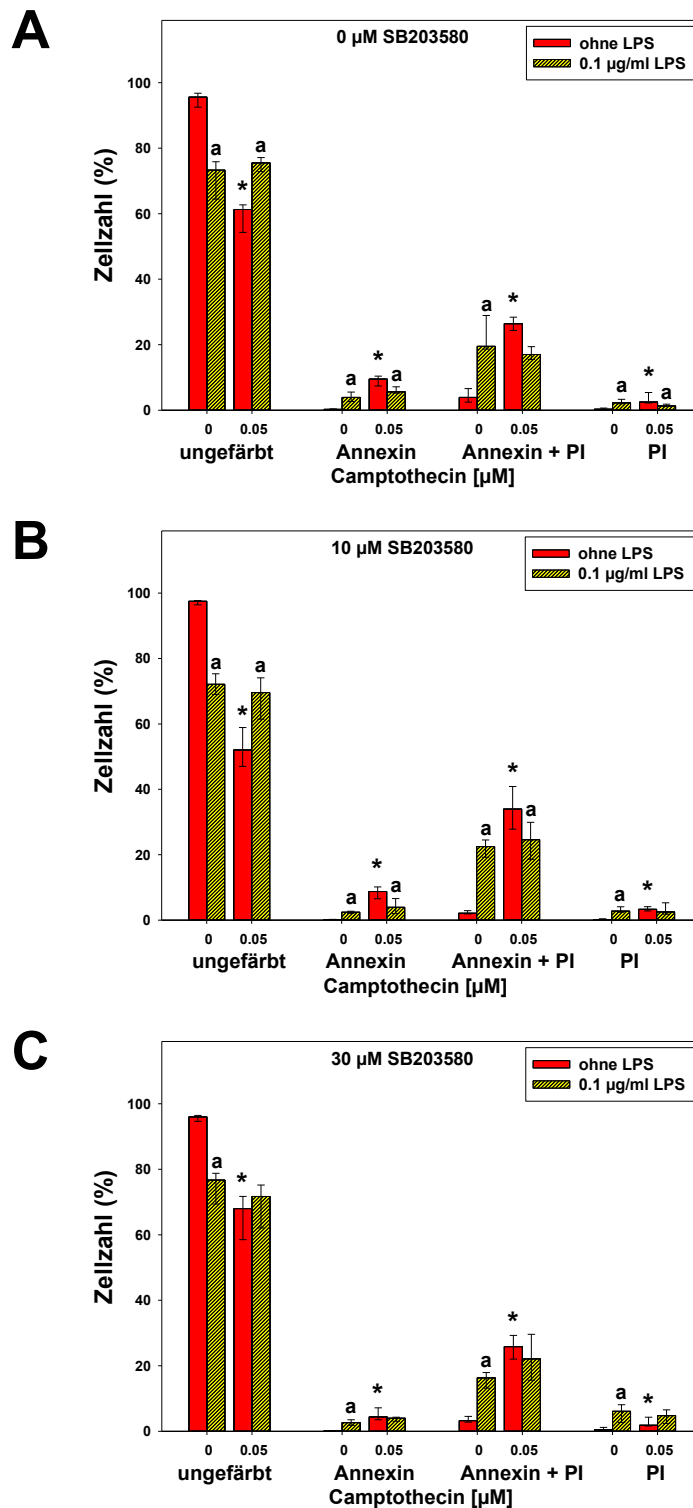


Abb. 12: Der Einfluss des p38 Inhibitors SB203580 auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen mit Camptothecin. Die Zellen wurden Camptothecin (0,05 μ M) mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (ungefärbt), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin & PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier (n=4) unabhängigen Experimenten. * = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median für Kulturen, die mit 0 μ M Camptothecin und 0 (A), 10 μ M (B) oder 30 μ M SB203580 (C) behandelt wurden; a = signifikanter Unterschied dieses Medianwerts zum Median derselben Kultur ohne Exposition gegen LPS.

4.2.5.3 Camptothecin-induzierte Apoptose nach Inhibition der MAPK JNK

In diesen Experimenten sinkt wieder die Zahl vitaler Zellen in den mit Camptothecin oder LPS behandelten Kulturen, und auch LPS entfaltet eine protektive Wirkung gegen die Zytotoxizität des Camptothecin (Abb. 13A). Der JNK Inhibitor SP600125 reduziert in einer Konzentration von 10 μ M die Zahl vitaler auf 91% verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Abb. 13A). Camptothecin wiederum reduziert in Anwesenheit von 10 μ M SP600125 die Zahl der vitalen Zellen auf 48% verglichen mit 62% vitalen Zellen in den nur Camptothecin exponierten Kulturen (Abb. 13 C). Dieser Effekt stammt jedoch zum Teil aus der Wirkung von SP600125 auf ansonsten unbehandelte Zellen. SP600125 scheint konzentrationsabhängig die Wirkung von LPS zu verstärken. Werden nur mit LPS noch 77% vitale Zellen nachgewiesen, so sinkt die Zahl der Zellen in Anwesenheit von 3 μ M SP600125 auf 63% und mit 10 μ M SP600125 noch weiter auf 50% (Abb. 13 A, B und C). Wie schon oben in den Experimenten mit HEMA gezeigt, scheint der JNK-Signalweg der Zytotoxizität von LPS entgegenzuwirken. Die schützende Wirkung von LPS gegen die Zytotoxizität von Camptothecin ist in Anwesenheit von SP600125 nicht mehr nachweisbar.

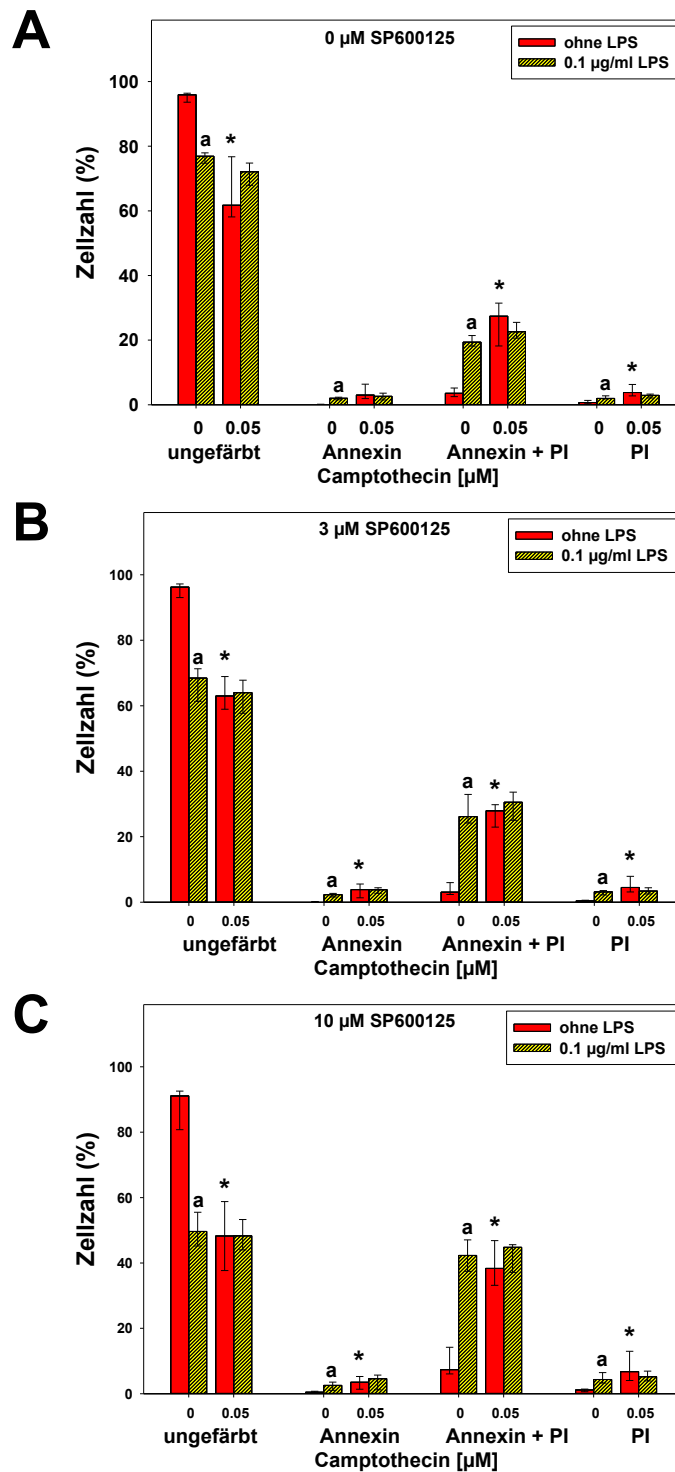


Abb. 13: Der Einfluss des JNK Inhibitor SP600125 (0, 3 und 10 μ M) auf die Apoptose in RAW264.7 Mausmakrophagen mit Camptothecin. Die Zellen wurden Camptothecin in der erwiesenermaßen zytotoxischen Konzentration von 0,05 μ M mit und ohne LPS (0.1 μ g/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (unstained= ungefärbt), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin & PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier (n=4) unabhängig ermittelten Experimenten.

4.2.5.4 Camptothecin-induzierte Apoptose in Gegenwart von NAC

Bei den Versuchen mit Camptothecin und NAC zeigt sich, dass NAC keine schützende, sondern eine verstärkende Wirkung auf die Toxizität von Camptothecin hat. In Anwesenheit von NAC überleben nur etwa 20% der Zellen, die auch Camptothecin exponiert werden im Gegensatz zu etwa 60%, wenn NAC fehlt (Abb. 14 B).

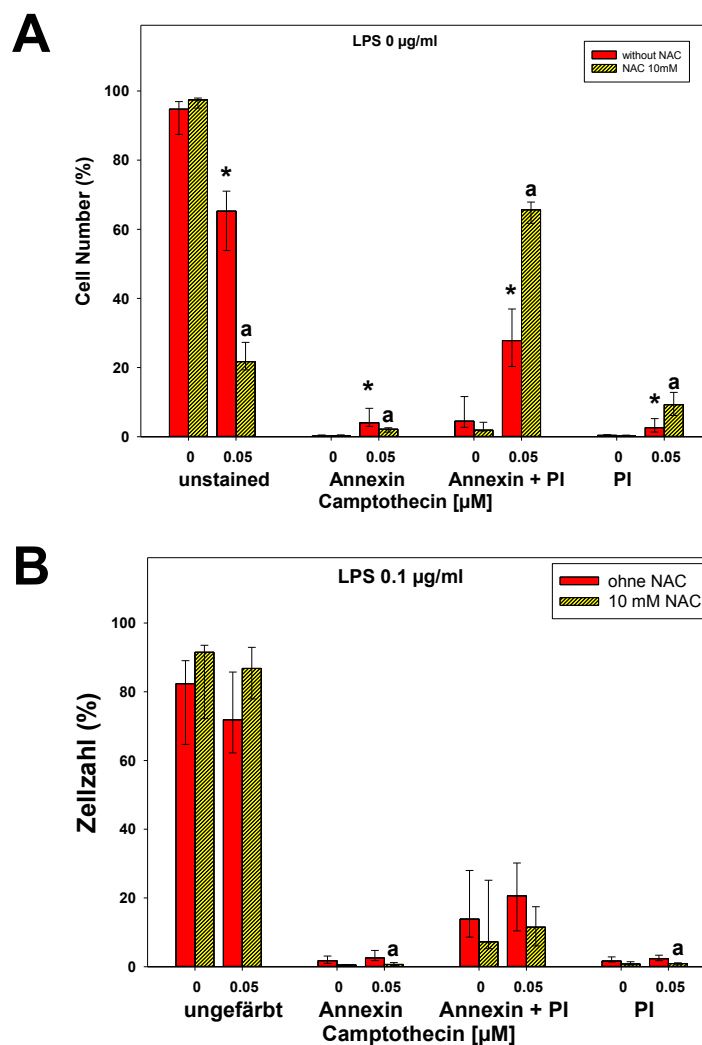


Abb. 14: Der Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) (10 mmol/L) auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen mit Camptothecin. Die Zellen wurden Camptothecin in der erwiesenermaßen zytotoxischen Konzentration von 0,05µM jeweils mit und ohne N-Acetylcystein (NAC) (10 mmol/L) und mit und ohne LPS (0.1 µg/ml) für 24 h ausgesetzt. Die Balken zeigen lebende Zellen (unstained = ungefärbt), Zellen in Apoptose (Annexin), Zellen in später Apoptose (Annexin & PI) und Zellen in Nekrose (PI) als Mediane (25% und 75% Perzentilen) aus vier unabhängig ermittelten Experimenten. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit in zwei Graphen.

In Anwesenheit von LPS war die Vitalität der Zellen auf etwa 80% reduziert, während in unbehandelten Kontrollen (Abb. 14A) mehr als 90% der Zellen vital waren. Die Wirkung von Camptothecin wird durch LPS nicht verändert, allerdings war der durch NAC gesteigerte zytotoxische Effekt von Camptothecin in Anwesenheit von LPS nun nicht mehr zu beobachten (Abb. 14 B).

5 Diskussion

Der direkte Kontakt dentaler Füllungswerkstoffe mit Gewebe des Mundraums erfordert ein detailliertes Verständnis der biologischen Wirkung von Werkstoffen einerseits und der spezifischen zellulären adaptiven Mechanismen andererseits. Nur so kann man den Verlauf und die Folgen dieser Art der zahnärztlichen Therapie abschätzen. In der klinischen Situation können Monomere wie TEGDMA und HEMA lokal auf Gewebe, etwa die Mundschleimhaut, in physiologisch relevanten Konzentrationen wirken. Wird andererseits beispielsweise in sehr tiefen Kavitäten mit einer verbleibenden Dentinstärke von weniger als 0,5 mm in manchen Dentinarealen ein Dentinadhäsiv direkt aufgetragen, so ist es wahrscheinlich, dass Monomere wie HEMA oder TEGDMA über Dentinkanälchen Pulpagewebe erreichen (Noda *et al.*, 2002; Michelsen *et al.*, 2008). Die lokalen Konzentrationen der Monomere dort werden in manchen Fällen wesentlich höher sein als diejenigen, die ausreichen, mit den momentan verwendeten, wenig sensitiven Nachweismethoden etwa zytotoxische Effekte in Zellkulturen nachzuweisen. Man sollte dabei durchaus bedenken, dass die direkte Applikation von Dentinadhäsiven auf die partiell eröffnete Pulpa *in vivo* - auch wenn gelegentlich in der Literatur andere Berichte erscheinen -, in den meisten Fällen zu Gewebeschäden in Form von Nekrosen und Entzündungsreaktionen führen kann. Als Folge davon wird die für die Wiederherstellung der Funktion eines geschädigten Zahnes wichtige Bildung von Tertiärdentin unterdrückt (Koliniotou-Koumpia und Tziafas, 2005; Accorinte *et al.*, 2008).

Basierend auf *in vitro*-Zellkultur-Experimenten mit unterschiedlichen Zielzellen wurden Monomere dentaler Füllungskunststoffe detektiert, die spezifisch verschiedene, vitale Zellfunktionen stören (Hanks *et al.*, 1991; Geurtsen, 2000). So ist seit langem bekannt, dass Monomere wie Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) oder 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) genotoxische Effekte herbeiführen, den Zellzyklus verzögern oder zytotoxisch wirken, indem sie Apoptose induzieren (Schweikl *et al.*, 2006; Krifka *et al.*, 2013).

Zielzellen dentaler Komposite können Zellen der Mundschleimhaut sein, aber auch Zellen des Dentin-Pulpa-Komplexes wie Odontoblasten, Fibroblasten, Progenitorzellen oder Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten (Yu und Abbott, 2007).

Als Modell für das zelluläre Immunsystem wurden alle Versuche der vorliegenden Arbeit mit RAW264.7 Mausemakrophagen durchgeführt. Diese gut charakterisierten

Zellen eignen sich neben ihren spezifischen Leistungen wie der Produktion von Zytokinen oder der Expression von Oberflächenmarkern allgemein sehr gut für das Bearbeiten der Thematik (Eckhardt *et al.*, 2009b). Vorrausgegangene Versuche zeigten, dass das Monomer TEGDMA in diesen Zellen auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) förderte und Apoptose induzierte (Eckhardt *et al.*, 2009a; Krifka *et al.*, 2012a). Auch die Rolle der mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) wurde im Rahmen der Induktion von Apoptose untersucht (Samuelson *et al.*, 2007; Eckhardt *et al.*, 2009a; Krifka *et al.*, 2010). So wurde erkannt, dass die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK1/2) und die Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK in Mausmakrophagen abhängig von der Expositionsdauer unterschiedlich phosphoryliert und verstärkt exprimiert wurden. Lange Expositionszeiten der Zellen gegen TEGDMA zeigten beispielsweise einen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 und p38-Kinasen. Ein kausaler Zusammenhang dieser Aktivierung der Expression und der Phosphorylierung von MAPK sowie der Transkriptionsfaktoren *downstream* in TEGDMA-behandelten Mausmakrophagen mit der parallel dazu induzierten Apoptose wurde nun vermutet, bisher jedoch nicht nachgewiesen (Krifka *et al.*, 2010; Krifka *et al.*, 2012a).

5.1 Zytotoxizität von HEMA

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die HEMA-induzierte Zytotoxizität anhand zweier seit langem etablierter Parameter identifiziert (Krifka *et al.*, 2012b). Zum einen wurde mit dem Kristallviolett-Test die Zahl überlebender Zellen bestimmt. Die Intensität der reversiblen Färbung von DNA-Proteinkomplexen mit dem Farbstoff Kristallviolett (Gentianaviolett) steigt unter den hier gewählten Bedingungen mit der Zellzahl (Flick und Gifford, 1984). Zum anderen wurde der Grad der Vitalität der HEMA-exponierten und überlebenden Zellen anhand der Färbung mit Annexin und PI auf der Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Vermes *et al.*, 1995; Zhao, 2010).

HEMA reduziert konzentrationsabhängig die Zahl überlebender Zellen. Die Konzentrationsabhängigkeit dieser Zellreaktion zu ermitteln, ist wesentlich für die Interpretation der Ergebnisse, denn sie verweist auf die Wirksamkeit von HEMA in einem physiologisch relevanten Bereich. Die Analysen der HEMA-induzierten Apoptose wiederum zeigen eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der

Zahl vitaler Makrophagen und parallel dazu vor allem einen erhöhten Anteil an Zellen in der späten Phase der Apoptose. Die Darstellung dieser Zellpopulation von Zellen, die nicht nur mit Annexin V sondern auch mit Propidiumiodid gefärbt werden, ließe vermuten, dass HEMA nicht Apoptose sondern Nekrose verursachen könnte. Aktuelle Ergebnisse zur Analyse der Regulation von oxidativem Stress und der damit kausal verknüpften Induktion von Apoptose zeigen aber, dass HEMA in RAW264.7 Mausmakrophagen durchaus Apoptose induzieren kann. Die Stimulierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors Nrf2 mit der elektrophilen Substanz tertiär-Butylhydrochinon (tBHQ) und die anschließende Exposition von Zellen gegen HEMA verschiebt die Zahl der Zellen aus der späten Apoptose in die Phase der frühen Apoptose (Gallorini *et al.*, 2015).

Überdies stimmen die hier erzielten Ergebnisse auch mit früheren Beobachtungen der HEMA-induzierten Apoptose überein (Ansteinsson *et al.*, 2011; Krifka *et al.*, 2012b; Schweikl *et al.*, 2014).

Äußerst bemerkenswert ist, dass unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen steigende HEMA-Konzentrationen die Zytotoxizität von LPS verstärkt inhibieren, bis mit 4-6 mM HEMA und 0,1 µg/ml LPS die Vitalität exponierter Zellen in etwa so hoch ist wie in unbehandelten Kulturen. Diese Beobachtung verweist auf zwei an sich getrennte Mechanismen der zytotoxischen Wirkung von HEMA und LPS. Andererseits gibt es offensichtlich eine Wechselwirkung (*cross talk*) dieser Mechanismen, die bisher jedoch nicht bekannt sind. Überlegungen dazu werden unten skizziert. Dieses Ergebnis ist auch für die klinische Praxis außerordentlich relevant. Die Kenntnis der Grundzüge dieser Wechselwirkung zwischen Monomeren wie HEMA und Produkten kariogener Keime wie LPS würde unmittelbar neue therapeutische Notwendigkeiten und Möglichkeiten für die Versorgung tiefer kariöser Läsionen mit dentalen Kompositen aufzeigen.

5.2 Die Bedeutung von MAPK für die Zytotoxizität von HEMA

Apoptose und Nekrose sind verschiedenen Formen des Zelltods. Neuere Analysen beschreiben anders als früher nun beide Prozesse als aktiv und physiologisch (Nicholson und Thornberry, 2003; Galluzzi *et al.*, 2014).

Die drei MAPK ERK1/2, JNK und p38 sind zentrale Regulatoren zellulärer Signalwege, die auch Apoptose auslösen oder das Überleben von Zellen fördern, die

besonderen Stressfaktoren ausgesetzt sind. So ist die direkte Korrelation von Apoptose und Aktivierung von MAPK für eine Reihe von toxischen und genotoxischen Substanzen und Agenzien nachgewiesen. Welche der MAP-Kinasen spezifisch Apoptose induziert, ist wohl abhängig von den aktivierenden Faktoren, den betroffenen Zelltypen oder der Höhe und der Dauer des Stresses (Matsuzawa und Ichijo, 2005).

Obwohl allgemein angenommen wird, dass ERK die Zellproliferation und das Zellüberleben fördert und die Stresskinasen JNK/p38 nicht nur davon verschiedene, sondern sogar entgegengesetzte Wirkung haben, darf man aufgrund neuerer Untersuchungen vermuten, dass auch JNK und p38 Funktionen für das Zellüberleben oder die Zelldifferenzierung haben (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Die Bildung von ROS scheint ein wesentlicher Faktor für die Aktivierung von MAPK zu sein. Sowohl ERK1/2 als auch JNK/p38 wurden als Reaktion auf oxidativen Stress aktiviert und bestimmen dann Zellüberleben oder Apoptose (Tobiume *et al.*, 2001; Matsuzawa *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die spezifischen Inhibitoren PD98059, SB203580 und SP600125 verwendet, um die Bedeutung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK für die HEMA-induzierte Apoptose zu testen. Die hier in Vorversuchen ermittelten Konzentrationen der drei Inhibitoren wirken intrazellulär, denn die Zahl überlebender Zellen im Kristallviolett-Test wird ebenso reduziert wie die Zellvitalität in den Analysen der Induktion von Apoptose. Allerdings wurde mit keinem der Inhibitoren eine Veränderung der Wirkung von HEMA in den RAW264.7 Mausemakrophagen anhand der beiden Parameter Zellüberleben (Kristallviolett-test) oder Induktion von Apoptose nachgewiesen. Auch die konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen den Effekten von HEMA und LPS erfolgt unabhängig von den Inhibitoren der MAPK. So zeigen diese Ergebnisse, dass die MAPK-Signalwege wohl keine direkte Bedeutung für die Induktion von Apoptose durch HEMA haben. Diese Besonderheit gilt sehr wahrscheinlich allgemein für dentale Methacrylate, denn in Analysen mit TEGDMA wurden den hier erzielten Ergebnissen vergleichbare Effekte beobachtet (Krifka *et al.*, 2012a). Andererseits wurde aber auch berichtet, dass die Stresskinasen p38 oder JNK möglicherweise doch eine Funktion bei der Wirkung von TEGDMA übernehmen könnten (Samuelsen *et al.*, 2007).

5.3 Die Bedeutung von NAC für die HEMA-induzierte Apoptose

Die Verwendung des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) inhibierte die HEMA-induzierte Apoptose vollständig. Dieser Effekt wurde zwar auch früher mit HEMA und anderen Monomeren wie TEGDMA wiederholt beobachtet, wird jedoch hier wegen neuer Hypothesen zum Mechanismus der Wirkung von NAC als Antioxidans nochmals ausführlich diskutiert (Krifka *et al.*, 2012a; Krifka *et al.*, 2012b). Die Bedeutung der hier erzielten originellen und neuen Ergebnisse zur Wirkung von NAC in Kombination mit LPS wird erst im folgenden Kapitel diskutiert (siehe unten).

NAC ist eine unmittelbare Vorstufe zur Synthese von Glutathion. Dieses Tripeptid wird aus Glycin, Cystein und Glutamat synthetisiert und ist das wichtigste nicht-enzymatische Antioxidans zur Redox-Regulierung der Zellen (Forman *et al.*, 2009; Lu, 2009). Die Fähigkeit der antioxidativen Wirkung von GSH wird durch die reversible Oxidation der Sulfhydrylgruppe (-SH) gewährleistet (Brigelius-Flohe, 1999; Lu, 2009). Die intrazelluläre Redox-Homöostase selbst wird durch ein komplexes System antioxidativer nicht-enzymatischer und enzymatischer Komponenten gesteuert und ist die Basis für die physiologische Funktion der Zellen (Halliwell, 1999; Circu und Aw, 2010).

Dentale Monomere reduzieren die Menge an intrazellulärem Glutathion (GSH), während die Konzentration an oxidiertem Glutathion (GSSG) nicht steigt (Engelmann *et al.*, 2002; Walther *et al.*, 2004). Parallel dazu nimmt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu (Schweikl *et al.*, 2006). Beide Effekte zusammen lassen vermuten, dass Monomere den Gehalt an verfügbarem Glutathion senken, weil sie kovalent Glutathion binden, das dann als Antioxidans ausfällt, so dass als Folge davon die Menge an ROS sekundär zunimmt und oxidativer Stress entsteht (Nocca *et al.*, 2010; Samuelsen *et al.*, 2011; Krifka *et al.*, 2013).

NAC gleicht als Antioxidans ein Monomer-induziertes Ungleichgewicht der zellulären Redoxhomöostase aus. Dabei ist momentan unklar, auf welche Weise NAC diese Funktion erfüllt. NAC könnte wegen der SH-Gruppen des Cysteins selber als Antioxidans wirken (Krifka *et al.*, 2013). Ein davon völlig verschiedener Mechanismus wäre die kovalente Bindung von NAC an intrazellulär verfügbare Monomere, so dass deren wirksame Konzentration sinkt. In der Tat wurden NAC-Monomer-Addukte experimentell nachgewiesen (Samuelsen *et al.*, 2011). Andererseits hält NAC als Vorstufe von Glutathion dessen zelluläre Konzentration auf einem konstant hohen

Niveau (Krifka *et al.*, 2012b). Wahrscheinlich und auch plausibel ist, dass sämtliche Mechanismen zu der beobachteten Wirkung von NAC, die Inhibition von oxidativem Stress, beitragen.

Aktuelle Ergebnisse verweisen auf Monomer-induzierten oxidativen Stress als eine sehr wesentliche Ursache biologischer Reaktionen auf dentale Kompositmaterialien (Schweikl *et al.*, 2006; Eckhardt *et al.*, 2009b; Krifka *et al.*, 2013). In Monomer-exponierten Zellkulturen wurden neben der Abnahme der Konzentration von Glutathion und einer erhöhten Bildung von ROS, Phänomene wie Zelltod durch Apoptose, verzögerte Zellproliferation sowie gestörte Mineralisationsprozesse oder inhibierte Funktionen des zellulären Immunsystems beobachtet und damit assoziiert (Krifka *et al.*, 2013). Kausale Zusammenhänge zwischen der Bildung von ROS und diesen Phänomenen sind momentan in den meisten Fällen unklar (Schweikl *et al.*, 2006). Allerdings wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Glutathion und der Monomer-induzierten Apoptose gezeigt. Eine experimentell herbeigeführte Verarmung der Zellen an Glutathion senkt drastisch die Zahl vitaler Zellen in HEMA-exponierten Zellkulturen und erhöht parallel dazu die Zahl der Zellen in Apoptose (Krifka *et al.*, 2012b).

ROS wie Superoxid-Anionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder hochreaktive Hydroxylradikale (OH^\bullet) entstehen physiologisch durch eine unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff (Droge, 2002; Genestra, 2007). Sie werden somit nicht nur als zelluläre Antwort auf exogene Stresssignale erzeugt, sondern sind auch Produkte des aeroben Stoffwechsels eukaryotischer Zellen. Sie bilden ein biologisches Paradoxon, da sie nicht nur toxisch, sondern auch als Signalmoleküle wirken. So können beispielsweise ROS chemisch mit Atomen der Zielproteine reagieren und zu Proteinmodifikationen führen. Neben nachteiligen Effekten auf Lipide und Proteine interagieren ROS wahrscheinlich mit Teilen der DNA (Memisoglu und Samson, 2000; Wilson *et al.*, 2003). Dabei können DNA-Schäden, wie Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen oder DNA-Protein-Quervernetzungen entstehen, die schließlich eine Destabilität des Genoms bewirken können (Tsunoda *et al.*, 2010; Berquist und Wilson, 2012).

Es wurde gezeigt, dass verschiedene dentale Monomere genotoxische und mutagene Wirkungen *in vitro* induzieren können (Schweikl *et al.*, 2006). Diese genotoxische Wirkung wird durch NAC inhibiert (Schweikl *et al.*, 2007).

Inzwischen wurde auch ein hypothetischer Mechanismus formuliert, der als Ursache

der Monomer-induzierten Apoptose genotoxische Effekte in Form von oxidativen DNA-Schäden vorschlägt, die ausgehend von DNA-Doppelstrangbrüche über die Aktivierung der Proteinkinase ATM den intrinsischen Weg der Apoptose anstoßen (Schweikl *et al.*, 2014). Als reaktive Sauerstoffspezies, die an den Monomer-induzierten Effekten beteiligt sein könnte, wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) identifiziert, das nach langen Expositionszeiten (24h) nachgewiesen wurde. Nach einer kurzen Expositionszeit (1h) werden jedoch auch noch andere Arten von ROS in HEMA-exponierten Zellen detektiert (Gallorini *et al.*, 2015).

Zu klären bliebe momentan die Quelle von ROS, die zu Monomer-induziertem oxidativen Stress beiträgt. Diese Kenntnis könnte in der zahnmedizinische Therapie mit dentalen Kompositen neue Strategien aufzeigen, die Bildung von oxidativem Stress, und damit eines zellulären Redoxungleichgewichts zu inhibieren. Aktuell werden zwei plausible Hypothesen über die Bildung von ROS auf der Grundlage der chemischen Natur der GSH- und Methacrylat-Monomere diskutiert. Zum einen erscheint es wahrscheinlich, dass ROS im Stoffwechsel von Kunststoffmonomeren oder als Folge ihrer Wirkung auf die ROS-produzierenden Enzymaktivitäten erzeugt werden. Alternativ könnten ROS sekundär aufgrund von GSH-Mangel durch die intrazelluläre Bildung von GSH-Monomer Addukten gebildet werden (Nocca *et al.*, 2011; Samuelsen *et al.*, 2011).

5.4 Der Einfluss von LPS auf die HEMA-induzierte Apoptose

Lipopolysaccharide (LPS) als bakterielle Endotoxine stellen für die Pulpa eine wichtige Herausforderung im Rahmen der restaurativen Therapie dar. Bakterien, die unter der Restauration belassen wurden, oder zwischen dem Kavitätenboden und dem Komposit durch einen Randspalt einwandern, haben unter ungünstigen Umständen direkten Kontakt zu Pulpazellen (Mutoh *et al.*, 2007).

Trotz verbesserter Materialien und Techniken treten Randspalten *in vivo* auf, vor allem bei Kavitätenrändern unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze (Hahn *et al.*, 2008) in technisch anspruchsvollen Situationen. Bakterien, vor allem ihre Toxine wie die Lipopolysaccharide Gram-negativer Keime, sind in tiefen kariösen Läsionen vorhanden und können eine Entzündung der Pulpa hervorrufen (Mutoh *et al.*, 2007). Es ist außerdem bekannt, dass bakterielle Endotoxine eine Dentin-Brückenbildung (Tertiärdentin) nach Pulpenüberkappung verhindern (Rutherford und Gu, 2000).

Daher stressen in besonderen klinischen Situationen sowohl Bakterien als auch Monomere das Pulpagewebe und können Reaktionen in Zielzellen gemeinsam beeinflussen. Auch bei Lipopolysaccharid (LPS) als bakterielles Endotoxin spielen MAP-Kinasen in der Signaltransduktion in von Bakterien ausgelösten Zellreaktionen auf das angeborene Immunsystem eine Rolle. LPS, ein Glycolipid in der äußeren Bakterienmembran, bindet in eukaryotischen Zellen an ein spezielles extrazelluläres Protein (LPB), dann an die Zelloberflächenantigene CD14 und MD-2, einem Komplex, der vom Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) immunkompetenter Zellen wie Makrophagen erkannt wird (Ulevitch, 2000; Miyake, 2004). In der Literatur gilt CD14 als der klassische LPS-Rezeptor (Ulevitch, 1993). Dieser Komplex von Proteinen aktiviert seinerseits MyD88-abhängige (*myeloid differentiation factor 88*) und MyD88-unabhängige Signalwege, die den Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) aktivieren (Garantziotis *et al.*, 2008; Napetschnig und Wu, 2013).

Durch Zellexposition gegen dentale Monomere wie HEMA oder bakterielles LPS werden zelluläre Signalübertragungskaskaden aktiviert, die die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF α , die Induktion von Apoptose oder auch die Aktivierung des MAP-Kinase-Systems steuern (Brown *et al.*, 2011; Krifka *et al.*, 2013).

Wichtig für die Regulation dieser Signalwege ist, dass etwa die Freisetzung von Zytokinen mit einem LPS-induzierten oxidativen Stress aufgrund der erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden ist. Ein erhöhter oxidativer Stress aktiviert schließlich die über NF κ -B vermittelte Signaltransduktion und die Genexpression von Zytokinen (Chang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Nishio *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit induziert LPS alleine in der verwendeten Konzentration eine Reduktion der Zellzahl (Kristallviolett-Test) sowie Apoptose (frühe und späte Phase). Es fällt auf, dass die MAPK ERK1/2 und JNK die durch LPS alleine inhibierte Zellvitalität (Apoptose), nicht aber die Zahl der Zellen (Kristallviolett-Test) weiter reduzieren können. Zellproliferation, die mit dem Kristallviolett-Test detektiert wird und Apoptose werden also von LPS auf unterschiedlichen Signalwegen modifiziert. Die Bedeutung von ERK1/2 und JNK für die Funktion von LPS ist ein sehr wesentlicher Unterschied zu den Beobachtungen mit HEMA, dessen Wirkung hier durch MAPK nicht modifiziert wurde. Zum einen sinkt die Vitalität in Zellpopulationen, die LPS in Gegenwart von PD98059 exponiert wurden und parallel dazu steigt die

Zahl der Zellen in der frühen und späten Phase der Apoptose sowie in der Phase der Nekrose. Damit schützt der MEK1/2-Signalweg die Mausmakrophagen über einen aktuell nicht bekannten Mechanismus vor einer LPS-induzierten Apoptose und eine ähnliche Funktion scheint auch der JNK-Signalweg zu übernehmen. Für die LPS-induzierte Apoptose wurden zwei unabhängige und ganz verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Apoptose könnte in den LPS-exponierten Zellen sehr früh und vor allem durch die autokrine Sekretion von TNF- α ausgelöst werden. Zum anderen könnte Apoptose in einer späten Phase durch die vermehrte Bildung von NO (Stickstoffmonoxid) verursacht werden (Xaus *et al.*, 2000).

Neben dem Einfluss der beiden MAPK auf die Wirkung von LPS ist die wechselseitige Inhibition der Wirkung von LPS und HEMA aufschlussreich. Dass LPS auch die Zytotoxizität von Camptothecin inhibiert ist bemerkenswert, soll allerdings hier nicht weiter diskutiert werden, weil Camptothecin lediglich als positive Kontrolle zur Überprüfung der Methoden verwendet wurde und nicht als Werkzeug zur Interpretation zellulärer Mechanismen.

Geringe Konzentrationen von HEMA inhibieren die LPS-induzierte Apoptose. Zum anderen hemmt umgekehrt die hier verwendete Konzentration von LPS die Induktion von Apoptose durch hohe Konzentrationen (6-8 mM) von HEMA. Der inhibitorische Einfluss von HEMA auf die Induktion von Apoptose durch LPS ist unabhängig von MAPK, denn keiner der hier verwendeten spezifischen MAPK-Inhibitoren verändert diese Wechselwirkung. Eine pharmakologische Beeinflussung von MAPK an dieser Stelle ist also keine therapeutische Option in der klinischen Praxis. Lediglich für LPS alleine erschließen sich mit Inhibitoren des ERK1/2- oder des JNK-Signalwegs potentiell therapeutische Möglichkeiten.

Die Tatsache der Wechselwirkung von LPS und HEMA verweist unmittelbar auf zwei getrennte zelluläre Signalwege mit einem Schnittpunkt (*crosstalk*). Das Antioxidans NAC wiederum hat eine protektive Wirkung sowohl gegen die Wirkung von LPS als auch von HEMA. Die protektive Wirkung geringer HEMA-Konzentrationen (1 mM) gegen den zytotoxischen Effekt von LPS wird in Anwesenheit von NAC sogar verstärkt. Dabei ist die beobachtete Reduktion von oxidativem Stress ein wahrscheinlicher Mechanismus, das Überleben von Zellen zu befördern, der aber möglicherweise durch die Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) ergänzt wird (Paranjpe *et al.*, 2009). ROS oder auch RNS (reaktive Stickstoffspezies) und oxidativer Stress scheinen also für die Funktion von LPS und HEMA wesentlich zu

sein. Auffällig ist allerdings, dass 8 mM HEMA die Zellvitalität auf weniger als 60% reduziert und dieser Effekt von NAC vollständig inhibiert wird. Der zytotoxische Effekt von 0,1 µg/ml LPS hingegen, der in etwa so groß ist wie derjenige von 8 mM HEMA, wird von NAC nur zu einem kleinen Teil gehemmt. Dies lässt vermuten, dass der mit der Wirkung von LPS verbundene oxidative Stress eher klein ist oder aber die in Gegenwart von HEMA oder LPS erhöhten Mengen von ROS/RNS für HEMA und LPS verschieden sind und möglicherweise von NAC unterschiedlich neutralisiert werden.

Äußerst bemerkenswert ist, dass sich bei einem Konzentrationsbereich von 4 mM HEMA die Wirkungen von LPS und HEMA aufheben, keine Induktion von Apoptose durch die beiden Substanzen erkennbar ist. Möglicherweise gibt es eine Balance von ROS, die durch die Konzentration von HEMA und den damit ausgelösten Effekten reguliert wird. MAPK haben für die Wirkung von HEMA keine erkennbare Funktion. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die beiden redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF-κB oder Nrf2 für diese Effekte wichtig sind und HO-1 (Hämoxygenase) als Verbindungsglied zwischen beiden getrennten Signalwegen fungiert. Die beiden ROS-sensitiven Pathways werden möglicherweise durch lokal unterschiedliche H₂O₂-Konzentrationen mit verschiedener Kinetik aktiviert (Marinho *et al.*, 2014).

So könnte eine Stimulation von Zellen des Immunsystems mit LPS zunächst eine moderat erhöhte Menge an ROS erzeugen und auf diese Weise NF-κB aktivieren. Der Kreislauf der LPS- und ROS-induzierten und über den NF-κB-Signalweg vermittelten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, die ihrerseits NF-κB noch mehr aktivieren und damit eine Überproduktion an proinflammatorischen Zytokinen erzeugen, könnte durch die redoxsensitive Aktivierung des Nrf2-System gehemmt werden. Nrf2 könnte über HO-1 die LPS-stimulierte erhöhte Produktion von ROS inhibieren (Kim *et al.*, 2010; Buelna-Chontal und Zazueta, 2013).

Vor kurzem wurde die Aktivierung von Nrf2 in HEMA-exponierten Zellen nachgewiesen (Gallorini *et al.*, 2015). Auf dieser Wechselwirkung der durch LPS und HEMA differenziell aktivierten NF-κB- und Nrf2-Pathways könnte auch die beschriebene Inhibition der LPS-induzierten Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF- α oder IL -6 oder des anti-inflammatorischen IL -10 basieren (Eckhardt *et al.*, 2009b; Bolling *et al.*, 2012; Bolling *et al.*, 2013).

Wahrscheinlich spielt auch hier das von TEGDMA oder HEMA verursachte zelluläre Redox-Ungleichgewicht eine entscheidende Rolle (Eckhardt *et al.*, 2009a).

6 Zusammenfassung

Dentale Kunststoffe treten in direkten Kontakt mit humanen Geweben, insbesondere in tiefen Kavitäten mit dünner bis nicht mehr vorhandener Restdentinschicht mit der Zahnpulpa. Die direkte und indirekte Wirkung der enthaltenen Monomere auf die Pulpazellen sowie deren Antwort darauf ist noch in weiten Teilen unklar. Dass der programmierte Zelltod eine Folge des Kontakts von Monomeren in entsprechend hoher Konzentration auf Zellen ist, wurde gezeigt. Über welchen Signalweg Apoptose aber intrazellulär induziert wird, ist noch nicht ausreichend erforscht. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) die die zelleigene Kapazität redox-regulierender Mechanismen übersteigt, ist sehr wahrscheinlich der Grund für Zellschädigung.

Der Ansatz dieser Arbeit war, die Induktion der Apoptose durch HEMA, ein häufiges Monomer zahnärztlicher Komposite, über die Signaltransduktionskaskade der MAP-Kinasen zu prüfen. Es wurde mit RAW264.7 Mausemakrophagen als gut untersuchte Zellen des Immunsystems gearbeitet. Durch pharmakologische Inhibitoren PD98059 (Inhibitor von MEK1/2), SB203580 (Inhibitor von p38) und SP600125 (Inhibitor von JNK1-3) wurden die MAP-Kinasen selektiv inhibiert.

Die mit HEMA inkubierten Zellen wurden nach Färbung der apoptotischen und nekrotischen Zellen mit Annexin und PI mittels FACS Analyse vermessen und die Anteile von Zellen in den verschiedenen Stadien des Zelltods (Apoptose und Nekrose) quantifiziert. Camptothecin, eine bekannt zelltoxische Substanz, diente als Positiv-Kontrolle. LPS, ein bakterielles Endotoxin, diente als Stimulator von MAP-Kinasen sowie NAC als zelluläres Antioxidans. Außerdem wurde durch den Kristallviolett-Test mit den gleichen Ansätzen die Zahl überlebender Zellen (Zytotoxizität) ermittelt.

Es zeigte sich im Kristallviolett-Test ebenso wie in den FACS Analysen, dass steigende Konzentrationen von HEMA die Zahl überlebender Zellen reduzierten. Die Inhibitoren PD98059 und SP600125 hatten im Gegensatz zu SB203580 im Kristallviolett-Test alleine eine stärkere Abnahme der Anzahl überlebender Zellen zur Folge. In der FACS Analyse zeigten alle drei Inhibitoren, dass sie in die Zellen gelangten, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die mit HEMA assoziierte Apoptose hatten.

LPS alleine führte in der verwendeten Konzentration sowohl zu einer Reduktion der Zellzahl (Kristallviolett-Test) sowie in der FACS Analyse zur Apoptose (frühe und späte Phase), wobei in Gegenwart von LPS hohe HEMA-Konzentrationen signifikant weniger effektiv waren.

Camptothecin reduzierte die Zellzahl wie erwartet signifikant, wobei auch hier LPS scheinbar diesem Effekt entgegenwirkte. Der Einfluss von LPS auf die Wirkung von Camptothecin war jedoch unabhängig von den Inhibitoren der MAPK ERK1/2, p38 und JNK.

Keiner der inhibierten MAP-Kinase-Signalwege zeigte eine signifikante Änderung des Zellüberlebens oder der Inhibition der Apoptose durch HEMA und sie besitzen wohl keine direkte Bedeutung für die Induktion von Apoptose durch HEMA.

Andererseits scheint der MEK1/2-Signalweg über einen aktuell nicht bekannten Mechanismus Einfluss auf die LPS-induzierte Apoptose zu nehmen. Die Mausmakrophagen wurden ähnlich wie beim JNK-Signalweg vor einer LPS-induzierten Apoptose geschützt.

Auffallend war der schützende Effekt von LPS. Sowohl Zellen, die mit HEMA inkubiert wurden, als auch diese mit Camptothecin, zeigten in Versuchen mit LPS deutlich mehr vitale Zellen. Geringe Konzentrationen von HEMA inhibierten die LPS-induzierte Apoptose. Umgekehrt hemmte die hier verwendete Konzentration von LPS die Induktion von Apoptose durch hohe Konzentrationen (6-8 mM) HEMA. Die konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen den Effekten von HEMA und LPS erfolgte unabhängig von den Inhibitoren der MAPK und verweist auf zwei getrennte zelluläre Signalwege mit einem Schnittpunkt (*crosstalk*).

Protektive Wirkung zeigte vor allem NAC, indem es als Antioxidans ein Monomer- oder LPS-induziertes Ungleichgewicht der zellulären Redoxhomöostase ausglich. Es ist von einem komplexen redox-sensitiven System aus proapoptotischen und zellüberlebenden Faktoren auszugehen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	11
Basismonomere, Comonomere und Moleküle für die Polymerisationsreaktion der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite.	
Abb.2:	38
Graphische Darstellung der ermittelten FACS-Daten. Die Beispiele zeigen unbehandelte Zellkulturen (A) und Zellen, die mit Camptothecin behandelt wurden (B).	
Abb. 3:	41
Die Zytotoxizität von HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen unter dem Einfluss des MEK1/2-Inhibitors PD98059.	
Abb. 4:	42
Die Zytotoxizität von HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen unter dem Einfluss des p38-Inhibitors SB203580.	
Abb. 5:	43
Die Zytotoxizität von HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen unter dem Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125.	
Abb. 6:	44
Die Zytotoxizität von Camptothecin in RAW264.7 Mausemakrophagen unter dem Einfluss der MAPK-Inhibitoren PD98059 (oben), SB203580 (Mitte) und SP600125 (unten).	
Abb. 7:	46
Die Induktion von Apoptose durch HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen in Experimenten mit dem MEK1/2-Inhibitor PD98059.	
Abb. 8:	48
Die Induktion von Apoptose durch HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen in Experimenten mit dem p38-Inhibitor SB203580.	
Abb. 9:	50
Die Induktion von Apoptose durch HEMA in RAW264.7 Mausemakrophagen in Experimenten mit dem JNK-Inhibitor SP600125.	
Abb. 10:	52
Der Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) (10 mmol/L) auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen.	
Abb. 11:	54
Der Einfluss des MEK Inhibitors PD98059 auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen mit Camptothecin.	
Abb. 12:	56
Der Einfluss des p38 Inhibitors SB203580 auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen mit Camptothecin.	
Abb. 13:	58
Der Einfluss des JNK Inhibitor SP600125 (0, 3 und 10µM) auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen mit Camptothecin.	
Abb. 14:	59
Der Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) (10 mmol/L) auf die Apoptose in RAW264.7 Mausemakrophagen mit Camptothecin.	

8 Literaturverzeichnis

Accorinte, M. L., Loguercio, A. D., Reis, A. und Costa, C. A. (2008) Response of human pulps capped with different self-etch adhesive systems. *Clin Oral Investig* 12:119-127.

Aicher, A., Shu, G. L., Magaletti, D., Mulvania, T., Pezzutto, A., Craxton, A. und Clark, E. A. (1999) Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J Immunol* 163:5786-5795.

Ansteinsson, V., Kopperud, H. B., Morisbak, E. und Samuelsen, J. T. (2013) Cell toxicity of methacrylate monomers-the role of glutathione adduct formation. *J Biomed Mater Res A* 101:3504-3510.

Ansteinsson, V., Solhaug, A., Samuelsen, J. T., Holme, J. A. und Dahl, J. E. (2011) DNA-damage, cell-cycle arrest and apoptosis induced in BEAS-2B cells by 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Mutat Res* 723:158-164.

Ardite, E., Sans, M., Panes, J., Romero, F. J., Pique, J. M. und Fernandez-Checa, J. C. (2000) Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 80:735-744.

Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y., Tonosaki, K. und Fujisawa, S. (2004) Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. *J Oral Rehabil* 31:1155-1164.

Atsumi, T., Iwakura, I., Fujisawa, S. und Ueha, T. (2001) The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. *Arch Oral Biol* 46:391-401.

Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Koidis, P. und Geurtsen, W. (2012) Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells. *Dent Mater* 28:327-339.

Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P. und Geurtsen, W. (2011) Effects of HEMA and TEDGMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dent Mater* 27:608-617.

Beckman, K. B. und Ames, B. N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272:19633-19636.

Berquist, B. R. und Wilson, D. M., 3rd (2012) Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett* 327:61-72.

Beutler, B. (2004) Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol* 4:498.

Bhoumik, A. und Ronai, Z. (2008) ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* 7:2341-2345.

Bolling, A. K., Ovreivik, J., Samuelsen, J. T., Holme, J. A., Rakkestad, K. E., Mathisen, G. H., Paulsen, R. E., Korsnes, M. S. und Becher, R. (2012) Mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP) induces TNF-alpha release and macrophage differentiation through different signalling pathways in RAW264.7 cells. *Toxicol Lett* 209:43-50.

Bolling, A. K., Samuelsen, J. T., Morisbak, E., Ansteinsson, V., Becher, R., Dahl, J. E. und Mathisen, G. H. (2013) Dental monomers inhibit LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW264.7. *Toxicol Lett* 216:130-138.

Bowen, R. L. (1963) Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc* 66:57-64.

Braga, R. R. und Ferracane, J. L. (2004) Alternatives in polymerization contraction stress management. *J Appl Oral Sci* 12:1-11.

Brigelius-Flohe, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27:951-965.

Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N. und Martin, M. (2011) TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* 90:417-427.

Brune, B. (2005) The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid Redox Signal* 7:497-507.

Bubici, C., Papa, S., Pham, C. G., Zazzeroni, F. und Franzoso, G. (2006) The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol* 21:69-80.

Buelna-Chontal, M. und Zazueta, C. (2013) Redox activation of Nrf2 & NF-kappaB: a double end sword? *Cell Signal* 25:2548-2557.

Buonocore, M. G. (1955) A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 34:849-853.

Cargnello, M. und Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:50-83.

Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouyssegur, J. und Lenormand, P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773:1299-1310.

Chandra, J., Samali, A. und Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29:323-333.

Chang, H. C., Lin, K. H., Tai, Y. T., Chen, J. T. und Chen, R. M. (2010) Lipoteichoic acid-induced TNF-alpha and IL-6 gene expressions and oxidative stress production in macrophages are suppressed by ketamine through downregulating Toll-like receptor 2-mediated activation of ERK1/2 and NFkappaB. *Shock* 33:485-492.

Chang, H. H., Guo, M. K., Kasten, F. H., Chang, M. C., Huang, G. F., Wang, Y. L., Wang, R. S. und Jeng, J. H. (2005) Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 26:745-753.

Chang, N. S. (2001) Hyaluronidase activation of c-Jun N-terminal kinase is necessary for protection of L929 fibrosarcoma cells from staurosporine-mediated cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 283:278-286.

Circu, M. L. und Aw, T. Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762.

- Cobb, M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71:479-500.
- Dauvillier, B. S., Aarnts, M. P. und Feilzer, A. J. (2000) Developments in shrinkage control of adhesive restoratives. *J Esthet Dent* 12:291-299.
- Delaviz, Y., Finer, Y. und Santerre, J. P. (2014) Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater* 30:16-32.
- Dnebosky, J., Hynkova, V. und Hrabak, F. (1975) Polymerizable amines as promoters of cold-curing resins and composites. *J Dent Res* 54:772-776.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Durner, J., Spahl, W., Zaspel, J., Schweikl, H., Hickel, R. und Reichl, F. X. (2010) Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater* 26:91-99.
- Eckhardt, A., Gerstmayr, N., Hiller, K. A., Bolay, C., Waha, C., Spagnuolo, G., Camargo, C., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2009a) TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials* 30:2006-2014.
- Eckhardt, A., Harorli, T., Limtanyakul, J., Hiller, K. A., Bosl, C., Bolay, C., Reichl, F. X., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2009b) Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 30:1665-1674.
- Engelmann, J., Leyhausen, G., Leibfritz, D. und Geurtsen, W. (2002) Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 63:746-751.
- Epe, B. und Hegler, J. (1994) Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol* 234:122-131.
- Ferracane, J. L. (1995) Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med* 6:302-318.
- Ferracane, J. L. (2011) Resin composite--state of the art. *Dent Mater* 27:29-38.
- Finer, Y., Jaffer, F. und Santerre, J. P. (2004) Mutual influence of cholesterol esterase and pseudocholinesterase on the biodegradation of dental composites. *Biomaterials* 25:1787-1793.
- Flick, D. A. und Gifford, G. E. (1984) Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68:167-175.
- Forman, H. J. und Torres, M. (2001) Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 22:189-216.
- Forman, H. J., Zhang, H. und Rinna, A. (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30:1-12.
- Frank, J., Pompella, A. und Biesalski, H. K. (2000) Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic Biol Med* 29:1096-1105.
- Galler, K. M., Schweikl, H., Hiller, K. A., Cavender, A. C., Bolay, C., D'Souza, R. N. und Schmalz, G. (2011) TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res* 90:257-262.

Gallorini, M., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K. A., Cataldi, A., Buchalla, W., Krifka, S. und Schweikl, H. (2015) Activation of the Nrf2-regulated antioxidant cell response inhibits HEMA-induced oxidative stress and supports cell viability. *Biomaterials* 56:114-128.

Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G. und Linkermann, A. (2014) Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin Cell Dev Biol* 35:24-32.

Garantziotis, S., Hollingsworth, J. W., Zaas, A. K. und Schwartz, D. A. (2008) The effect of toll-like receptors and toll-like receptor genetics in human disease. *Annu Rev Med* 59:343-359.

Genestra, M. (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19:1807-1819.

Genzlinger, A. (1999) Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch alpha,beta- ungesättigte Aldehyde und Ketone. <http://kluedo.ub.uni-kl.de/volltexte/2000/9/> (Sep 15, 2009).

Geurtsen, W. (1998) Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci* 106:687-695.

Geurtsen, W. (2000) Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:333-355.

Golding, S. E., Rosenberg, E., Neill, S., Dent, P., Povirk, L. F. und Valerie, K. (2007) Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Res* 67:1046-1053.

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. und Holbrook, N. J. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271:4138-4142.

Hahn, P., Weyen, G., Fischer, P., Plogmann, S. und Hannig, M. (2008) Marginal and internal adaptation of composite restorations to dentin in vivo and in vitro. *Am J Dent* 21:356-360.

Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31:261-272.

Halliwell, B. und Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281:9-19.

Hanks, C. T., Strawn, S. E., Wataha, J. C. und Craig, R. G. (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70:1450-1455.

Harijith, A., Ebenezer, D. L. und Natarajan, V. (2014) Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol* 5:352.

Hawley, T. S., Herbert, D. J., Eaker, S. S. und Hawley, R. G. (2004) Multiparameter flow cytometry of fluorescent protein reporters. *Methods Mol Biol* 263:219-238.

Hayakawa, T., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Takeda, K. und Ichijo, H. (2006) The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect* 8:1098-1107.

- Huang, H. und Manton, K. G. (2004) The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci* 9:1100-1117.
- Ilie, N. und Hickel, R. (2011) Resin composite restorative materials. *Aust Dent J* 56 Suppl 1:59-66.
- Imlay, J. A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77:755-776.
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Kaina, B. (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* 66:1547-1554.
- Katz, M., Amit, I. und Yarden, Y. (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1773:1161-1176.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kim, J., Cha, Y. N. und Surh, Y. J. (2010) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* 690:12-23.
- Koliniotou-Koumpia, E. und Tziafas, D. (2005) Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent* 33:639-647.
- Kostoryz, E. L., Zhu, Q., Zhao, H., Glaros, A. G. und Eick, J. D. (2007) Assessment of cytotoxicity and DNA damage exhibited by siloranes and oxiranes in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 634:156-162.
- Krifka, S., Hiller, K. A., Bolay, C., Petzel, C., Spagnuolo, G., Reichl, F. X., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2012a) Function of MAPK and downstream transcription factors in monomer-induced apoptosis. *Biomaterials* 33:740-750.
- Krifka, S., Hiller, K. A., Spagnuolo, G., Jewett, A., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2012b) The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials* 33:5177-5186.
- Krifka, S., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K. A., Spagnuolo, G., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2011) Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials* 32:1787-1795.
- Krifka, S., Petzel, C., Hiller, K. A., Frank, E. M., Bosl, C., Spagnuolo, G., Reichl, F. X., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2010) Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials* 31:2964-2975.
- Krifka, S., Spagnuolo, G., Schmalz, G. und Schweikl, H. (2013) A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 34:4555-4563.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. und Nomenclature Committee on Cell, D. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3-11.

Kuper, N. K., van de Sande, F. H., Opdam, N. J., Bronkhorst, E. M., de Soet, J. J., Cenci, M. S. und Huysmans, M. C. (2015) Restoration materials and secondary caries using an in vitro biofilm model. *J Dent Res* 94:62-68.

Kuwana, T. und Newmeyer, D. D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:691-699.

Lavin, M. F. und Gueven, N. (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13:941-950.

Lavoie, J. N., Rivard, N., L'Allemain, G. und Pouyssegur, J. (1996) A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* 2:49-58.

Lee, S. H., Lee, J. G., Kim, J. R. und Baek, S. H. (2007) Toll-like receptor 9-mediated cytosolic phospholipase A2 activation regulates expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 364:996-1001.

Lefeuvre, M., Bourd, K., Lorient, M. A., Goldberg, M., Beaune, P., Perianin, A. und Stanislawski, L. (2004) TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 83:914-919.

Li, J., Zhang, H., Huang, W., Qian, H. und Li, Y. (2012) TNF-alpha inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. *Curr Top Med Chem* 12:1408-1421.

Lim, B. S., Ferracane, J. L., Condon, J. R. und Adey, J. D. (2002) Effect of filler fraction and filler surface treatment on wear of microfilled composites. *Dent Mater* 18:1-11.

Lottner, S., Shehata, M., Hickel, R., Reichl, F. X. und Durner, J. (2013) Effects of antioxidants on DNA-double strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to methacrylate based monomers. *Dent Mater* 29:991-998.

Lu, S. C. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30:42-59.

Maehara, K., Oh-Hashi, K. und Isobe, K. I. (2001) Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J* 15:2025-2026.

Maekawa, T., Shinagawa, T., Sano, Y., Sakuma, T., Nomura, S., Nagasaki, K., Miki, Y., Saito-Ohara, F., Inazawa, J., Kohno, T., Yokota, J. und Ishii, S. (2007) Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol* 27:1730-1744.

Majno, G. und Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.

Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H. und Antunes, F. (2014) Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol* 2:535-562.

Matsuzawa, A. und Ichijo, H. (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7:472-481.

Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. und Ichijo, H. (2002) Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal* 4:415-425.

Memisoglu, A. und Samson, L. (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451:39-51.

Meyer, A. J. und Hell, R. (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res* 86:435-457.

Michelsen, V. B., Lygre, H., Skalevik, R., Tveit, A. B. und Solheim, E. (2003) Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 111:263-271.

Michelsen, V. B., Moe, G., Strom, M. B., Jensen, E. und Lygre, H. (2008) Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dent Mater* 24:724-731.

Mikkelsen, R. B. und Wardman, P. (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22:5734-5754.

Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 12:186-192.

Mjor, I. A. und Gordan, V. V. (2002) Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. *Oper Dent* 27:528-534.

Moens, U., Kostenko, S. und Sveinbjornsson, B. (2013) The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. *Genes (Basel)* 4:101-133.

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. und Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J* 20:6028-6036.

Munksgaard, E. C., Hansen, E. K. und Kato, H. (1987) Wall-to-wall polymerization contraction of composite resins versus filler content. *Scand J Dent Res* 95:526-531.

Murphy, L. O. und Blenis, J. (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31:268-275.

Mutoh, N., Tani-Ishii, N., Tsukinoki, K., Chieda, K. und Watanabe, K. (2007) Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *J Endod* 33:1183-1186.

Napetschnig, J. und Wu, H. (2013) Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* 42:443-468.

Nicholson, D. W. und Thornberry, N. A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306.

Nicholson, D. W. und Thornberry, N. A. (2003) Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 299:214-215.

Nishio, K., Horie, M., Akazawa, Y., Shichiri, M., Iwahashi, H., Hagihara, Y., Yoshida, Y. und Niki, E. (2013) Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biol* 1:97-103.

Nocca, G., D'Anto, V., Desiderio, C., Rossetti, D. V., Valletta, R., Baquala, A. M., Schweikl, H., Lupi, A., Rengo, S. und Spagnuolo, G. (2010) N-acetyl cysteine directed detoxification of 2-hydroxyethyl methacrylate by adduct formation. *Biomaterials* 31:2508-2516.

Nocca, G., Ragno, R., Carbone, V., Martorana, G. E., Rossetti, D. V., Gambarini, G., Giardina, B. und Lupi, A. (2011) Identification of glutathione-methacrylates adducts in gingival fibroblasts and erythrocytes by HPLC-MS and capillary electrophoresis. *Dent Mater* 27:e87-98.

Noda, M., Wataha, J. C., Kaga, M., Lockwood, P. E., Volkmann, K. R. und Sano, H. (2002) Components of dental adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res* 81:265-269.

Noda, M., Wataha, J. C., Lockwood, P. E., Volkmann, K. R., Kaga, M. und Sano, H. (2003) Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-alpha secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater* 19:101-105.

Paranjpe, A., Cacalano, N. A., Hume, W. R. und Jewett, A. (2009) N-acetyl cysteine mediates protection from 2-hydroxyethyl methacrylate induced apoptosis via nuclear factor kappa B-dependent and independent pathways: potential involvement of JNK. *Toxicol Sci* 108:356-366.

Paranjpe, A., Sung, E. C., Cacalano, N. A., Hume, W. R. und Jewett, A. (2008) N-acetyl cysteine protects pulp cells from resin toxins in vivo. *J Dent Res* 87:537-541.

Pelka, M., Distler, W. und Petschelt, A. (1999) Elution parameters and HPLC-detection of single components from resin composite. *Clin Oral Investig* 3:194-200.

Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M. und Pelling, J. C. (2000) Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem* 275:35778-35785.

Peutzfeldt, A. (1997) Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 105:97-116.

Puig-Kroger, A., Relloso, M., Fernandez-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabeu, C. und Corbi, A. L. (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98:2175-2182.

Raetz, C. R. und Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700.

Reichenberger, F. und Tamm, M. (2002) [N-acetylcystein in the therapy of chronic bronchitis]. *Pneumologie* 56:793-797.

Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R. und Ricciardi-Castagnoli, P. (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188:2175-2180.

Robinson JP (1993). *Handbook of flow cytometry methods*. New York: Wiley-Liss.

- Rochat, T., Lacroix, J. S. und Jornot, L. (2004) N-acetylcysteine inhibits Na⁺ absorption across human nasal epithelial cells. *J Cell Physiol* 201:106-116.
- Roos, W. P. und Kaina, B. (2013) DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 332:237-248.
- Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M. J. und Hauschildt, S. (2011) LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 31:379-446.
- Rueggeberg, F. A. (2002) From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent* 87:364-379.
- Rutherford, R. B. und Gu, K. (2000) Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *Eur J Oral Sci* 108:202-206.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Muller, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994) Damage to DNA by UV light and activation of transcription factors. *Biochem Pharmacol* 47:129-136.
- Sack U, Tárnok A, Rothe (Hrsg.) Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflussszytometrie. Karger 2007.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. und Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17:2596-2606.
- Samuelsen, J. T., Dahl, J. E., Karlsson, S., Morisbak, E. und Becher, R. (2007) Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater* 23:34-39.
- Samuelsen, J. T., Kopperud, H. M., Holme, J. A., Dragland, I. S., Christensen, T. und Dahl, J. E. (2011) Role of thiol-complex formation in 2-hydroxyethyl- methacrylate-induced toxicity in vitro. *J Biomed Mater Res A* 96:395-401.
- Santerre, J. P., Shajii, L. und Leung, B. W. (2001) Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 12:136-151.
- Schmalz, G. (1998) The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 106:696-706.
- Schmidt, M., Dige, I., Kirkevang, L. L., Vaeth, M. und Horsted-Bindslev, P. (2015) Five-year evaluation of a low-shrinkage Silorane resin composite material: A randomized clinical trial. *Clin Oral Investig* 19:245-251.
- Scholl, F. A., Dumesic, P. A., Barragan, D. I., Harada, K., Bissonauth, V., Charron, J. und Khavari, P. A. (2007) Mek1/2 MAPK kinases are essential for Mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Dev Cell* 12:615-629.
- Schweikl, H., Altmannberger, I., Hanser, N., Hiller, K. A., Bolay, C., Brockhoff, G., Spagnuolo, G., Galler, K. und Schmalz, G. (2005a) The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 26:4111-4118.

Schweikl, H., Hartmann, A., Hiller, K. A., Spagnuolo, G., Bolay, C., Brockhoff, G. und Schmalz, G. (2007) Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater* 23:688-695.

Schweikl, H., Hiller, K. A., Bolay, C., Kreissl, M., Kreismann, W., Nusser, A., Steinhauser, S., Wieczorek, J., Vasold, R. und Schmalz, G. (2005b) Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 26:1713-1719.

Schweikl, H., Hiller, K. A., Eckhardt, A., Bolay, C., Spagnuolo, G., Stempf, T. und Schmalz, G. (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 29:1377-1387.

Schweikl, H., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K. A., Buchalla, W. und Krifka, S. (2014) 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM- and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. *Biomaterials* 35:2890-2904.

Schweikl, H., Schmalz, G. und Rackebrandt, K. (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res* 415:119-130.

Schweikl, H., Schmalz, G. und Spruss, T. (2001) The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80:1615-1620.

Schweikl, H., Schmalz, G. und Weinmann, W. (2004) The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells in vitro. *J Dent Res* 83:17-21.

Schweikl, H., Spagnuolo, G. und Schmalz, G. (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 85:870-877.

Searle, J., Kerr, J. F. und Bishop, C. J. (1982) Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17 Pt 2:229-259.

Sevkusic, M., Schuster, L., Rothmund, L., Dettinger, K., Maier, M., Hickel, R., Van Landhuyt, K. L., Durner, J., Hogg, C. und Reichl, F. X. (2014) The elution and breakdown behavior of constituents from various light-cured composites. *Dent Mater* 30:619-631.

Shi, Y. (2004) Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117:855-858.

Sideridou, I. D. und Achilias, D. S. (2005) Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74:617-626.

Silikas, N., Eliades, G. und Watts, D. C. (2000) Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater* 16:292-296.

Soga, M., Matsuzawa, A. und Ichijo, H. (2012) Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *Int J Cell Biol* 2012:439587.

Soheili Majd, E., Goldberg, M. und Stanislawski, L. (2003) In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials* 24:3-9.

Son, Y., Kim, S., Chung, H. T. und Pae, H. O. (2013) Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol* 528:27-48.

Spagnuolo, G., D'Anto, V., Valletta, R., Strisciuglio, C., Schmalz, G., Schweikl, H. und Rengo, S. (2008) Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT. *J Endod* 34:684-688.

Spagnuolo, G., Desiderio, C., Riviuccio, V., Amato, M., Rossetti, D. V., D'Anto, V., Schweikl, H., Lupi, A., Rengo, S. und Nocca, G. (2013) In vitro cellular detoxification of triethylene glycol dimethacrylate by adduct formation with N-acetylcysteine. *Dent Mater* 29:e153-160.

Spagnuolo, G., Galler, K., Schmalz, G., Cosentino, C., Rengo, S. und Schweikl, H. (2004a) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 83:703-707.

Spagnuolo, G., Mauro, C., Leonardi, A., Santillo, M., Paterno, R., Schweikl, H., Avvedimento, E. V. und Rengo, S. (2004b) NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 83:837-842.

Stanislowski, L., Lefevre, M., Bourd, K., Soheili-Majd, E., Goldberg, M. und Perianin, A. (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 66:476-482.

Stanislowski, L., Soheili-Majd, E., Perianin, A. und Goldberg, M. (2000) Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblast: protective effect of N-acetyl cysteine. *J Biomed Mater Res* 51:469-474.

Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I. und Ichijo, H. (2008) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:199-225.

Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J. M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V. J., Mak, T. W. und Ingram, A. J. (2002) ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277:12710-12717.

Tanoue, T. und Nishida, E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15:455-462.

Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K. A. und Schweikl, H. (2002) Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18:318-323.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. und Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2:222-228.

Townsend, D. M., Tew, K. D. und Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 57:145-155.

Tsunoda, M., Sakaue, T., Naito, S., Sunami, T., Abe, N., Ueno, Y., Matsuda, A. und Takenaka, A. (2010) Insights into the structures of DNA damaged by hydroxyl radical: crystal structures of DNA duplexes containing 5-formyluracil. *J Nucleic Acids* 2010:107289.

Ulevitch, R. J. (1993) Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv Immunol* 53:267-289.

Ulevitch, R. J. (2000) Molecular mechanisms of innate immunity. *Immunol Res* 21:49-54.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. und Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P. und Van Meerbeek, B. (2011) How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater* 27:723-747.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51.

Vriz, S., Reiter, S. und Galliot, B. (2014) Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol* 108:121-151.

Wallace, S. S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33:1-14.

Walter, R., Boushell, L. W., Heymann, H. O., Ritter, A. V., Sturdevant, J. R., Wilder, A. D., Jr., Chung, Y. und Swift, E. J., Jr. (2014) Three-year clinical evaluation of a silorane composite resin. *J Esthet Restor Dent* 26:179-190.

Walther, U. I., Siagian, II, Walther, S. C., Reichl, F. X. und Hickel, R. (2004) Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 49:125-131.

Watson, W. H., Chen, Y. und Jones, D. P. (2003) Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors* 17:307-314.

Weinmann, W., Thalacker, C. und Guggenberger, R. (2005) Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 21:68-74.

Wiegand, A., Buchalla, W. und Attin, T. (2007) Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 23:343-362.

Wilson, D. M., 3rd, Sofinowski, T. M. und McNeill, D. R. (2003) Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci* 8:d963-981.

Wu, X., Kassie, F. und Mersch-Sundermann, V. (2005) Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds. *Mutat Res* 589:81-102.

Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A. F., Lloberas, J., Lopez-Soriano, F., Argiles, J. M., Bogdan, C. und Celada, A. (2000) LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* 95:3823-3831.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. und Greenberg, M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.

Yamada, M., Kojima, N., Paranjpe, A., Att, W., Aita, H., Jewett, A. und Ogawa, T. (2008) N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. *J Dent Res* 87:372-377.

Yamada, M., Ueno, T., Minamikawa, H., Sato, N., Iwasa, F., Hori, N. und Ogawa, T. (2010) N-acetyl cysteine alleviates cytotoxicity of bone substitute. *J Dent Res* 89:411-416.

Yan, C., Lu, D., Hai, T. und Boyd, D. D. (2005) Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J* 24:2425-2435.

Yoshii, E. (1997) Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37:517-524.

Yu, C. und Abbott, P. V. (2007) An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J* 52:S4-16.

Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J. und Ahmad, M. (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60:6-20.

Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R. und Crichton, R. R. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5:863-873.

Zhang, Z., Song, Q., Lin, M., Ding, Y., Kang, X. und Yao, Z. (1997) Immunomodulated signaling in macrophages: Studies on activation of Raf-1, MAPK, cPLA(2) and secretion of IL-12. *Sci China C Life Sci* 40:583-592.

Zhao, M. (2010) Molecular recognition mechanisms for detecting cell death in vivo. *Curr Pharm Biotechnol* 11:693-700.

9 Danksagung

Mein allergrößter Dank gebührt Herrn Professor Dr. Helmut Schweikl. Seine stets wohlwollende und hilfsbereite Art in allen Gesprächen, seine fachliche Kompetenz und besonders sein großes Engagement ließen diese Arbeit erst möglich werden. Herzlichen Dank!

Dem ehemaligen Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Herrn Prof. Dr. G. Schmalz danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl beginnen und durchführen zu können und die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Dem aktuellen Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Herrn Prof. Dr. W. Buchalla danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Lehrstuhl fertigstellen zu dürfen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Carola Bolay für ihre große Hilfsbereitschaft im Labor und die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit.

Danke auch an Dr. Karl-Anton Hiller für die statistische Auswertung der Daten sowie an das gesamte Laborteam des Forschungsbereichs der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie.

Vielen herzlichen Dank an meine Eltern und meinen guten Freund Kilian Hansen, die mich im Laufe dieser Arbeit sowie in allen Situationen maßgeblich unterstützt, und immer an das Gelingen geglaubt haben.